

Université de Montréal

**Effet d'agents nocifs sur la production de radicaux libres  
par les spermatozoïdes humains et sur leur viabilité**

par

Natalia Kotlova

Programme des sciences biomédicales

Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès Sciences

Avril 2003

© Natalia Kotlova, 2003



W

4

1158

2003

n. 098

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Effet d'agents nocifs sur la production de radicaux libres par les spermatozoïdes  
humains et sur leur viabilité**

présenté par :

Natalia Kotlova

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

D <sup>r</sup> Puttaswamy Manjunath,	président-rapporteur
D <sup>r</sup> Gilles Bleau,	directeur de recherche
D <sup>r</sup> Claude Giasson,	membre du jury

## Résumé

Le stress oxydatif contribue aux dysfonctions des spermatozoïdes et pourrait ainsi causer une infertilité masculine et des anomalies de développement embryonnaire. Des conditions telles l'utilisation de spermicides, le tabagisme et la cryopréservation des spermatozoïdes sont susceptibles de provoquer la formation de substances oxygénées réactives (SOR) par les spermatozoïdes et induire des dommages à l'ADN. Dans cette étude, la production de SOR par les spermatozoïdes a été mesurée par chimiluminescence en présence de luminol.

Les résultats indiquent que le fluorure de myristalkonium (MKF) n'augmente pas la production de SOR par les spermatozoïdes. De plus, la coloration de Sternheimer appliquée pour la première fois aux spermatozoïdes dans ce travail, révèle que le MKF n'entraînerait pas de dommages à l'ADN. De même, la congélation du sperme sans cryoprotecteurs ne provoque pas la génération de SOR. Enfin, le taux de formation de SOR par les spermatozoïdes de fumeurs ne semble pas différent de celui non fumeurs.

**Mots-clés :** spermatozoïdes, radicaux libres, chimiluminescence, coloration vitale

## **Abstract**

Oxidative stress contributes to sperm dysfunctions and could cause male infertility as well as abnormalities in embryo development. The aim of this study was to investigate the effect of cigarette smoking, sperm cryopreservation and exposure to a new spermicide, myristalkonium fluoride (MKF), on the production of reactive oxygen species (ROS) by spermatozoa. In this study, ROS production was measured by chemiluminescence with luminol as a probe. To simultaneously evaluate sperm viability and chromatin integrity, we developed and validated a new sperm staining method.

The results of this study indicate that exposure of spermatozoa to MKF does not cause ROS generation. Sperm cryopreservation without cryoprotectants does not provoke ROS formation that could cause DNA damage. Finally, the rate of ROS formation by spermatozoa from smokers does not appear to be different from that of non smokers.

**Keywords:** spermatozoa, reactive oxygen species, chemiluminescence, sperm staining

# Table des matières

<b>Résumé</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract</b>	<b>iv</b>
<b>Table des matières</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>x</b>
<b>Abréviations</b>	<b>xiii</b>
<b>Remerciements</b>	<b>xiv</b>
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Infertilité masculine</b>	<b>1</b>
<i>1.1.1 Les cas d'infertilité masculine</i>	<b>2</b>
<i>1.1.2 Traitements de l'infertilité masculine</i>	<b>8</b>
<b>1.2 Production des spermatozoïdes et leurs propriétés</b>	<b>9</b>
<i>1.2.1 La spermatogenèse</i>	<b>10</b>
<i>1.2.2 La structure du spermatozoïde</i>	<b>13</b>
<i>1.2.3 Les fonctions du spermatozoïde</i>	<b>15</b>
<i>1.2.4 Apoptose au cours de la spermatogenèse et dans le sperme</i>	<b>16</b>
<b>1.3 Les causes de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes</b>	<b>22</b>
<b>1.4 Substances oxygénées réactives dans les spermatozoïdes et le sperme</b>	<b>26</b>
<i>1.4.1 La nature et la formation des SOR</i>	<b>27</b>
<i>1.4.2 Les sources de SOR</i>	<b>31</b>
<i>1.4.3 Les piègeurs des SOR</i>	<b>32</b>
<i>1.4.4 Actions physiologiques et pathologiques des SOR</i>	<b>35</b>
<b>1.5 Méthodes de détection des SOR</b>	<b>40</b>
<b>2. OBJECTIFS DU PROJET DE LA RECHERCHE</b>	<b>44</b>
<b>3. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	<b>46</b>

<b>3.1 Sélection des sujets</b>	<b>46</b>
<b>3.2 Prélèvement du sperme</b>	<b>46</b>
<b>3.3 Spermogramme</b>	<b>46</b>
<b>3.4 Mesure de la production de substances oxygénées réactives (SOR)</b>	<b>47</b>
<b>3.5 Séparation des cellules du sperme sur gradient de Percoll</b>	<b>48</b>
<b>3.6 Mesure de la chimiluminescence des cellules du sperme induite par NADPH</b>	<b>48</b>
<b>3.7 Mesure de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes par la technique TUNEL</b>	<b>49</b>
<b>3.8 Préparation de frottis et coloration des spermatozoïdes selon Papanicolaou</b>	<b>50</b>
<b>3.9 Coloration des spermatozoïdes pour évaluer leur viabilité</b>	<b>50</b>
<i>3.9.1 Coloration des spermatozoïdes avec l'éosine et la nigrosine</i>	<b>50</b>
<i>3.9.2 Coloration des spermatozoïdes avec le colorant de Sternheimer</i>	<b>51</b>
<i>3.9.3 Coloration des spermatozoïdes avec l'éosine/nigrosine et avec le colorant de Sternheimer après traitement au fluorure de myristalkonium</i>	<b>51</b>
<b>3.10 Extraction et analyse de l'ADN des spermatozoïdes</b>	<b>52</b>
<b>3.11 Statistiques</b>	<b>52</b>
<b>4. RÉSULTATS</b>	<b>54</b>
<b>4.1 Production de SOR par les cellules du sperme</b>	<b>54</b>
<i>4.1.1 Mesure de la chimiluminescence basale des cellules du sperme</i>	<b>55</b>
<i>4.1.2 Mesure de la chimiluminescence des cellules du sperme induite par le PMA</i>	<b>61</b>
<i>4.1.3 Mesure de la chimiluminescence des cellules du sperme induite par le NADPH</i>	<b>63</b>
<i>4.1.4 Effet du MKF sur la production de SOR</i>	<b>67</b>
<b>4.2 Mesure de la production de SOR par les spermatozoïdes frais et congelés, de fumeurs et de non fumeurs</b>	<b>69</b>
<b>4.3 Coloration de Sternheimer appliquée aux spermatozoïdes</b>	<b>78</b>
<b>4.4 Effet du MKF sur la viabilité des spermatozoïdes</b>	<b>87</b>
<b>5. DISCUSSION</b>	<b>91</b>
<b>5.1 Production de SOR par les cellules du sperme</b>	<b>92</b>



<b>5.2 Effet du MKF sur la production de SOR par les cellules du sperme</b>	<b>95</b>
<b>5.3 Effet de la cryopréservation sur la production de SOR par les cellules du sperme</b>	<b>97</b>
<b>5.4 Effet du tabagisme sur la production de SOR par les cellules du sperme</b>	<b>99</b>
<b>5.5 Mise au point et validation d'une nouvelle méthode de la coloration des spermatozoïdes</b>	<b>100</b>
<b>6. CONCLUSION</b>	<b>104</b>
<b>7. BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>106</b>
<b>ANNEXE 1:</b>	<b>I</b>
<i>Tracés des mesures de la chimiluminescence des cellules du sperme induite par le PMA, en fonction du temps</i>	<b>I</b>
<b>ANNEXE 2:</b>	<b>II</b>
<i>Tracés des mesures de la chimiluminescence des cellules du sperme induite par le NADPH, en fonction du temps</i>	<b>II</b>
<b>ANNEXE 3:</b>	<b>III</b>
<i>Tracés des mesures de la chimiluminescence des cellules du sperme, frais et congelé, de fumeurs et de non fumeurs, en fonction du temps ; effet du NADPH et du MKF</i>	<b>III</b>

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 : Les valeurs normales des paramètres du spermogramme</b>	<b>3</b>
<b>Tableau 2 : Les causes et les traitements de l'infertilité masculine</b>	<b>4</b>
<b>Tableau 3 : Inducteurs et inhibiteurs de l'apoptose</b>	<b>19</b>
<b>Tableau 4 : Caractéristiques des échantillons de sperme utilisés dans l'étude des effet du MKF</b>	<b>56</b>
<b>Tableau 5 : Mesure de la chimiluminescence des cellules du sperme en présence de luminol</b>	<b>57</b>
<b>Tableau 6 : Examen cytologique du sperme après coloration par la technique de Papanicolaou</b>	<b>59</b>
<b>Tableau 7 : Effet du PMA sur la chimiluminescence de la fraction contenant les spermatozoïdes</b>	<b>62</b>
<b>Tableau 8 : Effet du NADPH sur la chimiluminescence de la fraction contenant les spermatozoïdes intacts</b>	<b>64</b>
<b>Tableau 9 : Effet du NADPH sur la chimiluminescence des spermatozoïdes perméabilisés</b>	<b>66</b>
<b>Tableau 10 : Effet du MKF sur la chimiluminescence de la fraction contenant les spermatozoïdes</b>	<b>68</b>
<b>Tableau 11 : Mesure de la chimiluminescence émise par les cellules à l'état frais du sperme d'hommes fumeurs et non fumeurs, et effet du NADPH et du MKF</b>	<b>70</b>
<b>Tableau 12 : Mesure de la chimiluminescence émise par les cellules du sperme congelé d'hommes fumeurs et non fumeurs et effet du NADPH et du MKF</b>	<b>71</b>
<b>Tableau 13 : Comparaison de deux méthodes de coloration vitale</b>	<b>83</b>

**Tableau 14 : Comparaison des mesures de la viabilité des spermatozoïdes  
traités au MKF, par coloration avec éosine/nigrosine et avec  
safranine/violet cristal**

## Liste des figures

<b>Figure 1 : Schéma du chromosome Y humain</b>	<b>6</b>
<b>Figure 2 : La structure du spermatozoïde</b>	<b>14</b>
<b>Figure 3 : Modélisation du processus apoptotique</b>	<b>18</b>
<b>Figure 4 : Principales classes de dommages de l'ADN</b>	<b>23</b>
<b>Figure 5 : Hypothèse de l'action de la topoisomérase dans l'ADN surenroulé</b>	<b>25</b>
<b>Figure 6 : Trois étapes dans le processus de la peroxydation lipidique</b>	<b>30</b>
<b>Figure 7 : Rôles physiologiques des SOR</b>	<b>36</b>
<b>Figure 8 : Les effets pathologiques des SOR sur le spermatozoïde</b>	<b>38</b>
<b>Figure 9 : Métabolisme et localisation subcellulaire des sondes détectant des SOR</b>	<b>41</b>
<b>Figure 10 : Réaction du luminol en présence de peroxyde d'hydrogène</b>	<b>43</b>
<b>Figure 11 : Analyse cytologique de l'échantillon de sperme</b>	<b>60</b>
<b>Figure 12 : Absence de dépendance entre la quantité des spermatozoïdes et leur chimiluminescence</b>	<b>73</b>
<b>Figure 13 : Effet du NADPH et du MKF sur la chimiluminescence des cellules du sperme frais, après lavage</b>	<b>74</b>
<b>Figure 14 : Effet du luminol, du NADPH et du MKF sur la chimiluminescence des cellules du sperme congelé/décongelé</b>	<b>75</b>
<b>Figure 15 : Mesure de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes de fumeurs</b>	<b>77</b>
<b>Figure 16 : Test de viabilité des spermatozoïdes traités au colorant de Sternheimer</b>	<b>79</b>
<b>Figure 17 : Test de viabilité des spermatozoïdes colorés à l'éosine/nigrosine</b>	<b>81</b>
<b>Figure 18 : Mesure de la viabilité des spermatozoïdes colorés selon la technique standardisée éosine/nigrosine versus safranine/violet cristal</b>	<b>84</b>

<b>Figure 19 : Droite de régression entre la viabilité des spermatozoïdes mesurée par les colorations à l'éosine/nigrosine et à la safranine/violet cristal</b>	<b>85</b>
<b>Figure 20 : Droite de régression de la viabilité des spermatozoïdes</b>	<b>86</b>
<b>Figure 21 : Comparaison de deux méthodes de coloration vitale des spermatozoïdes traités au MKF</b>	<b>89</b>

*À mes enfants : Svetlana, Ekaterina et Antonina*

## Abréviations

<b>ADN</b>	acide désoxyribonucléique
<b>AMP<sub>c</sub></b>	adénosine monophosphate cyclique
<b>ARN</b>	acide ribonucléique
<b>ARN<sub>m</sub></b>	acide ribonucléique messenger
<b>ARN<sub>r</sub></b>	acide ribonucléique ribosomal
<b>ARN<sub>t</sub></b>	acide ribonucléique de transfert
<b>ATP</b>	adénosine triphosphate
<b>dUTP</b>	désoxyuridine triphosphate
<b>ICSI</b>	injection intracytoplasmique d'un spermatozoïde
<b>EDTA</b>	acide éthylène diamine-tétraacétique
<b>FLMP</b>	N- formyl-méthyl-leucyl-phénylalanine
<b>GnRH</b>	gonadolibérine
<b>G6PD</b>	glucose-6-phosphate déshydrogénase
<b>GSH</b>	glutathion
<b>GXP</b>	glutathion peroxydase
<b>hCG</b>	gonadotrophine chorionique humaine
<b>HEPES</b>	acide N-2-hydroxyéthylpipérazine-N <sup>1</sup> -2-éthane sulfonique
<b>IP</b>	iodure de propidium
<b>LH</b>	hormone lutéinisante
<b>MDA</b>	dialdéhyde malonique
<b>MKF</b>	fluorure de myristalkonium
<b>NO<sup>•</sup></b>	oxyde nitrique
<b>NOS</b>	synthase de l'oxyde nitrique
<b>NADP / NADPH</b>	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (oxydé, réduit)
<b>OMS</b>	Organisation mondiale de la santé
<b>PKA</b>	protéine kinase A
<b>PMA</b>	phorbol myristyl acétate
<b>PBS</b>	salin physiologique
<b>RMN</b>	résonance magnétique nucléaire
<b>Rnase</b>	ribonucléase
<b>SOD</b>	superoxyde dismutase
<b>SOR</b>	substances oxygénées réactives
<b>TNPs</b>	protéines nucléaires de transition
<b>Trx</b>	thiorédoxine
<b>TUNEL</b>	«TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling»
<b>UV</b>	ultraviolet

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Gilles Bleau, mon directeur de maîtrise. Ses connaissances encyclopédiques et sa dextérité en manipulation biomédicale sont un exemple pour tous ceux qui ont eu le privilège de le côtoyer, et dont j'ai eu la chance de faire partie. Son enseignement m'a appris la précision et la patience mais surtout la philosophie de l'excellence que je me suis fixée comme objectif.

J'adresse mes remerciements au Dr Serguei Orlov qui m'a accueillie dans son laboratoire au centre de recherche de l'Hôpital Hôtel Dieu du CHUM et que j'ai consulté tout au long de ce projet. Je désire également remercier le Dr Yves Berthiaume du même centre de recherche pour l'utilisation du luminomètre, et les personnes qui m'ont enseigné la technique de chimiluminescence.

Je souhaiterais remercier le Dr Jean-Gilles Latour, directeur du Département de pathologie et biologie cellulaire, qui m'a permis d'utiliser l'appareil de microphotographie. Mes sincères remerciements au Dr Gilles Gariépy, directeur du laboratoire de pathologie de l'Hôpital Saint-Luc du CHUM, pour son aide à réaliser des photos de spermatozoïdes.

J'aimerais dire aussi un gros merci à Geneviève Laforest, étudiante à la maîtrise dans notre laboratoire, qui a effectué les mesures de fragmentation de l'ADN. Je tiens aussi à remercier tous les nombreux collaborateurs, collègues du Centre de recherche du CHUM et membres du personnel de l'hôpital que j'ai eu la chance de connaître et d'apprécier tout au long de ma maîtrise.

Finalement, je remercie mon cher Dary, le seul qui était toujours à mes côtés, pour son support moral et ses encouragements, surtout dans les moments difficiles. Je remercie mes proches sans lesquels ce mémoire n'existerait pas.



# 1. INTRODUCTION

## 1.1 Infertilité masculine

L'infertilité, définie comme l'incapacité d'un couple à concevoir après un an de rapports sexuels non protégés, demeure un problème clinique majeur (WHO, 1992). Dans le monde, on estime qu'environ 5 à 10% des couples éprouvent des difficultés à obtenir une grossesse désirée. En Europe, cette proportion pourrait atteindre un couple sur quatre (Schmidt et coll., 1995), une situation qui tendrait à s'aggraver avec les ans. Au Canada, le problème concerne quelque 500 000 personnes (Baird, 1994). Il est important de rappeler que l'infertilité peut être due à l'un ou l'autre des partenaires, ou aux deux à la fois. Alors que le conjoint présente une anomalie dans près de la moitié des cas (Comhaire et coll., 1987), l'infertilité masculine est une notion difficile à cerner.

Chez l'humain, on peut évaluer plusieurs paramètres du sperme mais non quantifier avec certitude le pouvoir fécondant des spermatozoïdes. En outre, des études récentes suggèrent une tendance à la détérioration de la qualité du sperme (Carlsen et coll., 1992; Hull, 1992 ; Thonneau et coll., 1991 ; Templeton, 1992 ; Auger et coll., 1995) ; la validité de ces études a toutefois été fortement contestée (Swan et coll., 1997; Vierula et coll., 1996; Bujan et coll., 1996 ; Bahadur et coll., 1996 ; Becker et Berhane, 1997. Jusqu'aux années 1970, la connaissance des facteurs exogènes pouvant affecter la fertilité masculine et leur impact dans les échecs de la reproduction accusaient un sérieux retard : on minimisait même l'existence d'une infertilité masculine. Au cours des trois dernières décennies, des progrès importants ont été réalisés dans ce domaine, surtout grâce à une meilleure connaissance de la biologie du spermatozoïde et à l'apport de la fécondation *in vitro* et de la micro-injection intracytoplasmique (ICSI).

### *1.1.1 Les cas d'infertilité masculine*

En clinique, l'exploration de la fertilité masculine vise d'abord à déceler les rares cas d'incapacité complète à procréer. Dans les autres situations, on tente d'évaluer la probabilité de fécondation spontanée et on donne les indications d'une procréation médicalement assistée (Thibault et Levasseur, 2001).

Au début de l'évaluation, les patients subissent un examen clinique du système reproducteur (testicules, épидидymes, canaux déférents), des dosages biologiques de la fonction endocrinienne (dosages de FSH, LH, prolactine et testostérone), et on évalue la qualité du sperme. Les paramètres les plus importants du spermogramme sont le volume du sperme ainsi que la numération, la mobilité et la morphologie des spermatozoïdes. Les critères de « normalité » retenus par l'Organisation mondiale de la santé (OMS) sont résumés au tableau 1.

Soulignons que l'interprétation des résultats doit tenir compte, à la fois, de la grande variabilité des paramètres d'un éjaculat à l'autre et de la faible valeur prédictive de chacune des caractéristiques. Selon plusieurs études (Bostofte et coll., 1982 ; Bendvold, 1989 ; Macomber et Sanders, 1999), la numération des spermatozoïdes n'est pas un paramètre fidèlement corrélé avec la fertilité. Il faut donc exercer une grande prudence avant de poser un diagnostic sur la base du spermogramme. Les anomalies les plus fréquentes du spermogramme concernent l'azoospermie, l'oligozoospermie et l'asthénospermie (tableau 2). On définit l'azoospermie comme l'absence totale de spermatozoïdes dans l'éjaculat. Ses causes peuvent être d'origine anatomique ou fonctionnelle, comprenant par exemple l'absence congénitale des canaux déférents et l'hypogonadisme rencontré dans le syndrome de Klinefelter. De plus, la chimiothérapie anticancéreuse, l'irradiation et l'intoxication par les métaux lourds peuvent provoquer l'azoospermie. L'hypotrophie testiculaire combinée à des taux plasmatiques élevés de FSH et bas d'inhibine B est le signe d'une atteinte de la spermatogenèse. À l'aide de marqueurs biochimiques pour les épидидymes (la L-carnitine libre et la  $\beta$  1,4-glucosidase neutre), la prostate (zinc, phosphatase acide, citrate) et les

**Tableau 1 : Les valeurs normales des paramètres du spermogramme**

<b>Paramètres</b>	<b>Valeurs normales</b>
Volume	$\geq 2,0$ mL
pH	7,2 à 8,0
Numération	$\geq 20 \times 10^6/\text{mL}$
Numération totale	$\geq 40 \times 10^6/\text{éjaculat}$
Mobilité (1 heure après l'éjaculation)	$\geq 50\%$ mobilité progressive
Mobilité (3 heure après l'éjaculation)	$\geq 30\%$ mobilité progressive
Morphologie	$\geq 30\%$ morphologie normale
Viabilité	$\geq 70\%$ de spermatozoïdes vivants
Leucocytes	$< 10^6/\text{mL}$
Zinc	$\geq 2,4$ $\mu\text{moles}/\text{éjaculat}$
Fructose	$\geq 1,3$ $\mu\text{moles}/\text{éjaculat}$
Carnitine	0,80 à 2,85 $\mu\text{moles}/\text{éjaculat}$

**Tableau 2 : Causes et traitements de l'infertilité masculine**

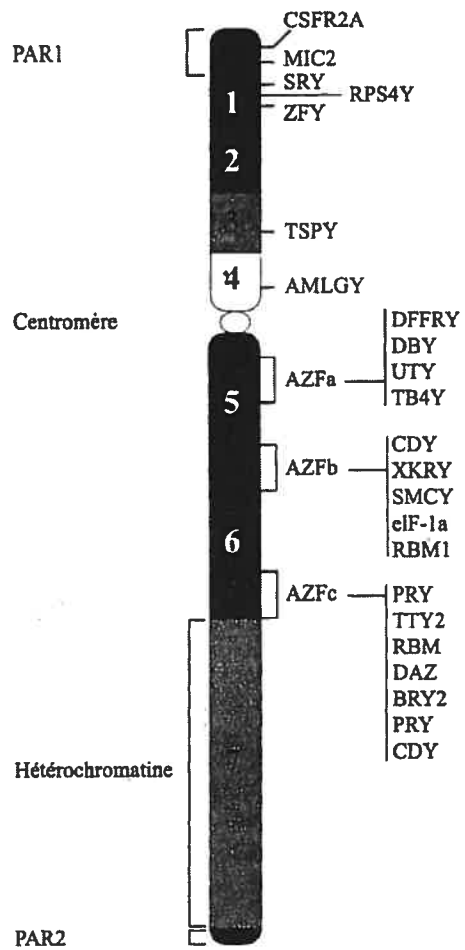
Nature et fréquence de la perturbation	Cause	Traitement curatif ou préventif
<b>1) Perturbations de l'éjaculation</b>		
Éjaculation rétrograde (3 - 6%)	-Lésion du sphincter du col vésical -Lésion du plexus hypogastrique -Neuropathie diabétique	AMP <sup>1</sup> avec spermatozoïdes recueillis dans les urines ou par ponction déférentielle
Anéjaculation (5 - 8%)	-Lésion médullaire -Psychogène -Médicaments (neuroleptiques, antidépresseurs, hypotenseurs)	AMP avec éjaculation provoquée Psychothérapie Suppression des médicaments si possible
<b>2) Perturbations spermatiques</b>		
Azoospermies excrétoires (7 - 10%)	<i>Congénitales :</i> - oblitérations des voies spermatiques - absence de déférent <i>Acquises :</i> - infections - lésions traumatiques du déférent - vasectomie intentionnelle	Chirurgie reconstructrice ou AMP avec spermatozoïdes épididymaires  Traitement anti-infectieux et anti-inflammatoire Chirurgie reconstructrice Autoconservation préalable/vasovasostomie
Azoospermies sécrétoires (7 - 10%)	Cryptorchidie bilatérale -Causes génétiques (Klinefelter, translocations équilibrées) - Orchite virale - Inexpliquées - Anorchidie - Aplasie germinale	Traitement médical (hCG) ou chirurgical  ICSI à partir de spermatozoïdes testiculaires Vaccination (oreillons) ICSI Recours possible à un don de sperme
Oligoasthénospermies (40 - 60%)	Causes hormonales (hypogonadisme hypogonadotrope, dysplasie olfactocongénitale, hyperprolactinémie, hémochromatose)  -Causes circulatoires (varicocèle) -Causes infectieuses (oblitération partielle ou unilatérale) Causes physiques : chaleur, rayons X ou Y -Médicaments (chimiothérapie anticancéreuse, sulfasalazine) -Causes toxiques (alcool, tabac, plomb, pesticides) -Inexpliquée	Induction de la spermatogénèse par les gonadotropines, ou traitement étiologique  Chirurgie ou embolisation Traitement anti-infectieux et anti-inflammatoire Récupération possible après arrêt, sinon AMP Autoconservation  Récupération possible après arrêt, sinon AMP AMP
Asthénospermies (10 - 15%)	-Auto-immunisation -Akinésie et dyskinésie par anomalies flagellaires	AMP (FIV ou ICSI) ; ICSI
Tératospermies (2 - 5%)	-Syndrome des têtes rondes : globozoospermie -Cape post-acrosomique absente	ICSI ICSI

<sup>1</sup> AMP : Assistance Médicale à la Procréation (FIV ou ICSI) .

vésicules séminales (fructose), on peut localiser le siège d'une obstruction du tractus génital (Thibault et Levasseur, 2001).

Des études récentes (Kerr et coll., 2000 ; Fox et coll., 2002 ; Aitken et Krausz, 2001) ont montré qu'un pourcentage supérieur à 20% de microdélétions au niveau du chromosome Y cause l'azoospermie alors que des taux intermédiaires sont associés le plus souvent à de l'oligozoospermie ; les hommes fertiles présentant moins de 0,7% de ces délétions. Il est bien établi que des gènes portés par le chromosome Y sont impliqués dans le développement des testicules et dans la spermatogenèse ; ceux reliés à l'infertilité masculine d'origine génétique se trouvent sur le bras long du chromosome Y (*Yq*). Des délétions dans cette région ont été observées dans le caryotype d'hommes atteints d'azoospermie sécrétoire. Vogt (1996) et Fox (2002) ont proposé l'existence d'un ou de plusieurs facteurs, nommés AZF (« Azoospermia Factor »), indispensables à la spermatogenèse et codés par des gènes portés par le chromosome Y. Trois régions différentes, avec des tailles de 1 à 2 Mb et nommées AZFa, AZFb et AZFc, ont été identifiées (figure 1). Des délétions dans la région AZFa causent le syndrome « Sertoli-Cell-Only » (SCO) caractérisé par un petit poids des testicules. Cette perturbation est causée par un arrêt de la spermatogenèse au stade préméiotique (Krausz et McElreavey, 1999).

Les microdélétions dans la région AZFb provoquent un arrêt de la spermatogenèse au stade méiotique : l'analyse histologique montre la présence de spermatogonies et de spermatocytes de premier ordre (Vogt et coll., 1996). Bien que les délétions de la région AZFc bloquent la spermatogenèse au stade post-méiotique, cette perturbation génétique conduit généralement à l'azoospermie et, en particulier, à l'oligozoospermie (Vogt et coll., 1996).



Régions pseudo autosomiques 1 et 2 : PAR1, PAR2. Régions AZFa, b et c et les gènes localisés dans chacune d'elles.

**Figure 1 : Schéma du chromosome Y humain (Thibault et Levasseur, 2001)**

On parle d'oligoasthénospermie lorsque la numération des spermatozoïdes dans l'éjaculat est inférieure à 20 millions par mL (tableau 1). Elle est parfois associée à une varicocèle, à une infection chronique (cas de prostatite, urétrite, vésiculite) ou à des maladies endocriniennes (tableau 2).

La présence de plus de 30% de spermatozoïdes de morphologie anormale correspond à la tératospermie. Certaines formes rares sont parfois découvertes, telle la globozoospermie où tous les spermatozoïdes présentent une tête ronde, dépourvue d'acrosome.

Lorsque le pourcentage des spermatozoïdes mobiles (catégories *a* et *b* selon l'OMS) est inférieur à 50%, ou celui de la catégorie *a* est inférieur à 25%, on parle alors d'asthénospermie. Certains cas d'oligoasthénospermie exigent des évaluations plus poussées des structures et des fonctions des spermatozoïdes : on recherche des anomalies flagellaires, acrosomiques et nucléaires (Thibault et Levasseur, 2001). Ces évaluations sont basées sur des tests fonctionnels décrits plus loin, et également sur une analyse cytologique quantitative.

Le nécrozoospermie (aucun spermatozoïde vivant dans le sperme) est un diagnostic grave car on ne connaît aucun traitement pour cette maladie.

Dans certains cas, le spermogramme révèle un ensemble d'anomalies que l'on désigne sous le terme oligoasthénotératospermie. Les causes étant souvent d'ordre génétique, il convient de rechercher des microdélétions au niveau du chromosome Y et d'examiner le caryotype somatique. Lorsqu'elle est identifiée, une telle condition requiert un conseil génétique.

Tel que résumé au tableau 2, les nombreuses causes d'infertilité masculine sont divisées en deux grandes catégories : les perturbations de l'éjaculat et les perturbations spermatiques.

### ***1.1.2 Traitements de l'infertilité masculine***

On distingue des méthodes thérapeutiques dites préventives, étiologiques, palliatives et substitutives pour traiter l'infertilité masculine. Chez l'enfant, en prévention de l'infertilité, la cryptorchidie (une malformation congénitale caractérisée par l'absence des testicules dans le scrotum suite à un défaut de migration dans la cavité abdominale) peut être traitée par injection de gonadotrophine chorionique (hCG) ou par abaissement chirurgical. Dans bien des cas cependant, l'orchidectomie s'impose afin d'éviter le cancer testiculaire. Chez l'adulte, la prévention des maladies transmises sexuellement devrait réduire le risque d'infection des voies génitales. En outre, il faut conserver préventivement le sperme avant la chimiothérapie, la radiothérapie et la chirurgie pour le cancer du testicule ou la maladie de Hodgkin.

On utilise des méthodes basées sur l'étiologie pour traiter une varicocèle, des azoospermies excrétoires et des formes d'hypogonadisme hypogonadotrope. Dans les cas d'azoospermie excrétoire, l'efficacité du traitement chirurgical dépend de la cause et du siège de l'obstruction : les obstructions de la tête de l'épididyme sont de plus mauvais pronostic que celles de la queue de l'épididyme. Cependant, la fécondation avec des spermatozoïdes prélevés chirurgicalement dans la tête de l'épididyme est possible, grâce à la congélation en vue d'une fécondation assistée par ICSI.

Le traitement médical des cas d'hypogonadisme hypogonadotrope est souvent très efficace : l'administration de gonadotrophines sur de longues périodes donne un pourcentage impressionnant de 80 à 90% de succès en terme de grossesses.



L'insémination artificielle avec le sperme du conjoint et la fécondation *in vitro* classique dans les cas d'oligoasthénospermie modérée sont deux exemples de méthodes palliatives qui donnent des résultats appréciables, avec un taux élevé de fécondation. La méthode ICSI permet la fécondation dans la plupart des cas d'infertilité masculine sévère ; elle se fait à partir de spermatozoïdes éjaculés, épидидymaires ou testiculaires (Salat-Baroux et coll., 1998). C'est le traitement palliatif idéal de l'oligoasthénospermie majeure, des azoospermies de type excrétoire et sécrétoire, et de l'iso-immunisation sévère. Toutefois, l'âge de la conjointe et le nombre de ses ovocytes constituent la limite principale de l'efficacité de cette méthode. Par contre, la micro-injection de spermatides rondes, voire de spermatocytes de deuxième ordre ou de spermatozoïdes contenant de l'ADN fragmenté est associée à un faible taux de succès, et son indication demeure discutable.

Dans les cas d'échec de l'ICSI d'origine purement masculine (agénésie testiculaire, aplasie germinale, arrêt de la maturation germinale, nécrozoospermie totale, défaut de facteur activateur de l'ovocyte, anomalies génétiques graves ou infections graves telle celle causée par le VIH), on utilise des méthodes substitutives avec sperme de donneurs.

## **1.2 Production des spermatozoïdes et leurs propriétés**

La finalité du système reproductif masculin réside dans la production de spermatozoïdes aptes à féconder un ovocyte et assurer ainsi la reproduction. Il s'avère donc important de connaître le processus de différenciation cellulaire par lequel les cellules souches se développent en spermatozoïdes matures. Ces notions permettent de découvrir les causes de l'infertilité masculine et, par la suite, d'élaborer des méthodes appropriées de traitement. Les mécanismes moléculaires, biochimiques et hormonaux qui contrôlent le développement des spermatozoïdes et l'acquisition de leurs fonctions nécessaires à la fécondation, seront résumés dans les pages qui suivent.

### **1.2.1 La spermatogenèse**

La spermatogenèse, le processus de développement et de maturation des spermatozoïdes, s'effectue en trois phases principales : une prolifération mitotique des spermatogonies qui produit un grand nombre de cellules souches, la division méiotique de ces cellules qui donne les spermatocytes et la cytodifférenciation des spermatides.

La migration des cellules germinales mâles vers les ébauches des testicules s'effectue durant la période embryonnaire ; les cellules germinales primordiales se rassemblent dans les cordons testiculaires formant les tubes séminifères. Ces derniers renferment des cellules de soutien, les cellules de Sertoli, entre lesquelles s'insèrent les premières cellules de la lignée germinale, les spermatogonies claires. Pendant la période fœtale, soit entre la 12<sup>e</sup> et la 20<sup>e</sup> semaine de grossesse, les cellules interstitielles du testicule (cellules de Leydig) produisent de grandes quantités de testostérone, l'hormone responsable de la différenciation des organes sexuels masculins et du phénotype masculin. Après cette période et jusqu'à la puberté, les cellules de Leydig deviennent quiescentes et leur morphologie s'apparente à celle des autres cellules du tissu conjonctif.

Lors du déclenchement de la puberté, l'hypophyse sécrète l'hormone lutéinisante (LH) qui stimule les cellules de Leydig et l'hormone folliculo-stimulante (FSH) qui agit sur les cellules de Sertoli. Sous l'action combinée de la FSH et de la testostérone, la spermatogenèse commence à se dérouler. Les tubes séminifères grossissent et s'allongent, remplissant des segments des testicules de leurs nombreuses circonvolutions. Alors que le nombre de cellules de Sertoli demeure constant (Drews, 1998), les cellules germinales se multiplient et se différencient. Ainsi, l'activité spermatogénique peut être évaluée par la taille du testicule.

Sur coupe histologique, les spermatogonies apparaissent serrées au fond des invaginations des cellules de Sertoli, jouxtant la lame basale. Elles sont alimentées par les cellules de Sertoli qui régulent leur développement.

Les spermatogonies souches sont de trois types : type A, type intermédiaire et type B (Drews, 1998). Elles ont un ou deux nucléoles distincts et des noyaux lobés. Chaque spermatogonie passe six divisions mitotiques. Les cellules filles se distinguent par leur structure nucléaire et leurs réactions aux colorants. Des cellules de type A ont quatre générations. Une cellule fille de type A4 peut se développer en spermatocyte de premier ordre ou quitter le clone des spermatogonies en devenant de nouveau une spermatogonie au repos, afin de conserver un nombre constant de cellules primordiales.

Même si les spermatogonies développées avancent vers la lumière des tubes séminifères, elles restent en contact avec la membrane basale. D'autre part, les cellules filles forment des ponts cytoplasmiques durant les divisions mitotiques des spermatogonies. En formant un syncytium, les cellules restent reliées jusqu'à leur différenciation en spermatozoïdes matures (Drews, 1998). Cette caractéristique de la spermatogenèse explique le synchronisme de la production des spermatozoïdes matures dans chaque région des tubes séminifères.

Après la dernière division, des spermatogonies de type B deviennent les spermatocytes en prophase de la première division de la méiose : de grandes cellules ovales au noyau arrondi présentant un nombre élevé de nucléoles (Drews, 1998).

Durant le stade préloptotène, l'ADN est synthétisé et les filaments chromosomiques sont rapidement répliqués. Par la suite, les spermatocytes passent les stades successifs qui se distinguent par diverses étapes du processus de spiralisation de leurs chromosomes (Thibault et Levasseur, 2001). Les stades suivants au cours de la prophase sont le leptotène, le zygotène, le pachytène, le diplotène et la diacinèse.

Au cours de la prophase de la première division, les spermatocytes de premier ordre pénètrent dans le compartiment adluminal (Drews, 1998). Ils se divisent ensuite une première fois en deux cellules filles ; les spermatocytes de second ordre. Par la suite, elles

passent la deuxième division en produisant les cellules filles qui deviennent les spermatides. Tandis que la première division méiotique entraîne la séparation des chromosomes homologues paternels et maternels appariés, dans la deuxième division, chaque chromatide est partagé entre deux spermatides haploïdes (Thibault et Levasseur, 2001).

Ces spermatides entament la spermiogenèse, processus durant lequel elles subissent plusieurs transformations morphologiques. Les spermatides s'allongent et deviennent des spermatides allongées. Le flagelle comprend entre autres l'axonème et les mitochondries organisées en spirale au niveau de la pièce intermédiaire. Il est relié à la tête spermatique par les centrioles. Au niveau de la tête, il se forme des régions équatoriales et postacrosomiale, impliquées dans la fusion entre le spermatozoïde et la membrane plasmique de l'ovocyte. L'acrosome, formé à partir d'une vésicule de l'appareil de Golgi, contient les enzymes nécessaires à la pénétration de la zone pellucide de l'ovocyte. Le noyau haploïde dans la tête du spermatozoïde renferme les chromosomes à l'état de chromatine compacte. Un corps résiduel sert d'appendice aux résidus cytoplasmiques superflus ; il est phagocyté par les cellules de Sertoli après la spermiation. Par ailleurs, les ponts cytoplasmiques qui reliaient les spermatides se rompent pendant la spermiation. Par la suite, les spermatozoïdes sont amenés, par le fluide testiculaire, des tubules séminifères vers l'épididyme où ils acquièrent leur mobilité et leur maturité. Chez l'homme, il faut environ 74 jours pour qu'une cellule germinale se développe de spermatogonie à spermatozoïde mature (Thibault et Levasseur, 2001).

Le transit des spermatozoïdes dans l'épididyme dure 6 jours, avec une durée plus longue dans la région caudale. Bien que des spermatozoïdes provenant du corps ou de la tête distale de l'épididyme aient déjà un pouvoir fécondant (Thibault et Levasseur, 2001), ils continuent à subir plusieurs modifications morphologiques avec la migration de la gouttelette cytoplasmique et la condensation de la chromatine. La chromatine se stabilise par les liaisons disulfures intra- et inter-moléculaires au niveau des protamines. Au cours

du transit dans l'épididyme, la synthèse des lipides est diminuée alors que le métabolisme oxydatif et glycolytique est augmenté. Le carnitine accumulée se transforme en acétylcarnitine, substrat énergétique préférentiel pour les spermatozoïdes.

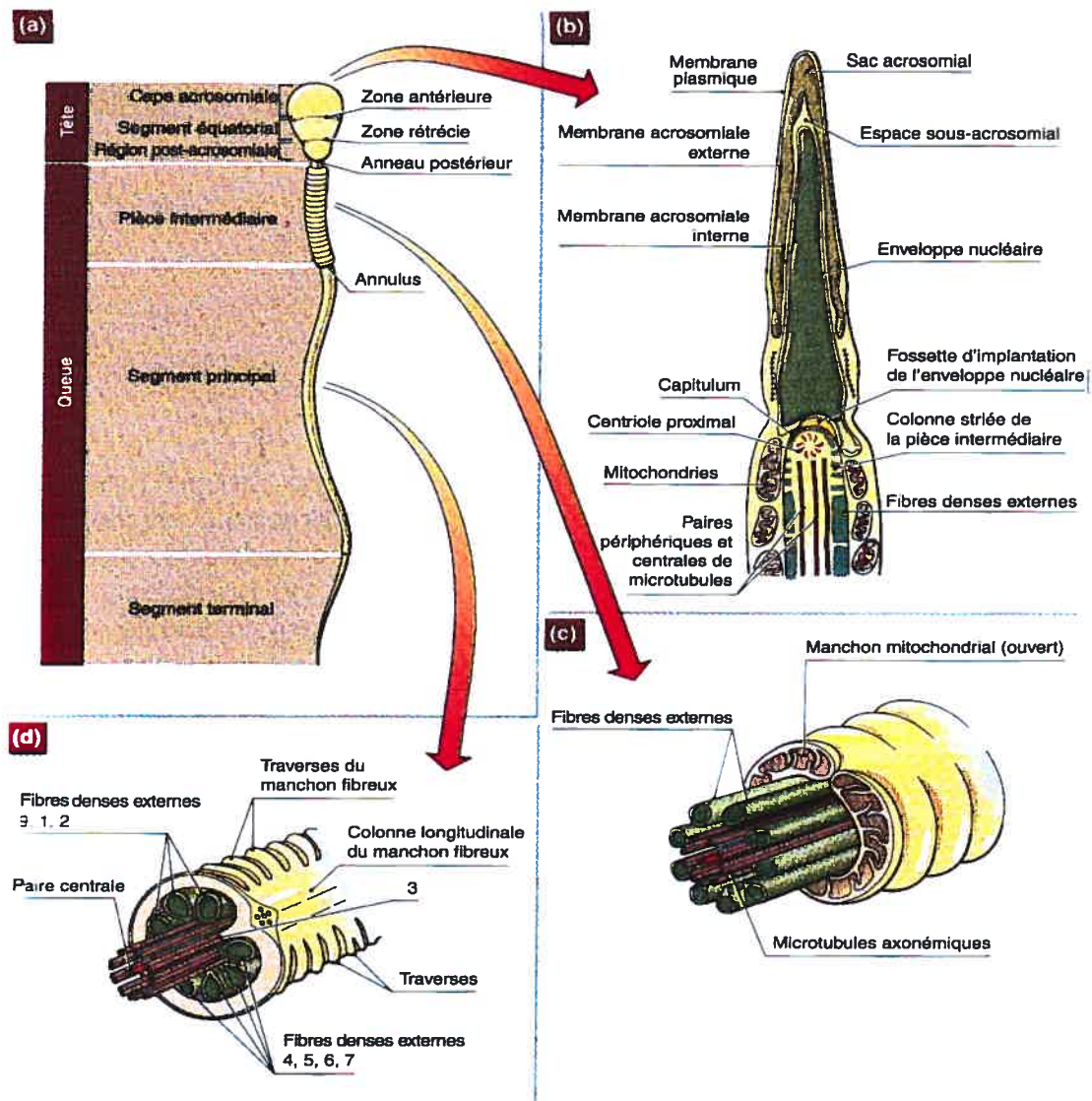
### *1.2.2 La structure du spermatozoïde*

En raison de leur fonction de livreur de l'ADN à l'ovocyte, les spermatozoïdes ont une structure morphologique unique. Ils ne possèdent pas les organites cytoplasmiques tels les ribosomes, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Cependant, les spermatozoïdes contiennent plusieurs mitochondries qui alimentent en ATP l'axonème du flagelle (figure 2). Le spermatozoïde est constitué d'une tête dans laquelle se trouve l'ADN extrêmement dense dans un noyau haploïde et d'un flagelle à l'aide duquel il se propulse. Ces deux parties morphologiquement et fonctionnellement distinctes sont entourées d'une membrane plasmique.

Dans chaque région, la membrane plasmique est structurée de façon typique quant à la composition en lipides, en saccharides, en charges de surface et en composants antigéniques. Cette composition diffère selon les zones adjacentes grâce aux structures limitrophes et aux liens moléculaires avec les éléments sous-jacents du cytosquelette.

La tête se compose de la cape acrosomiale, du segment équatorial et de la région post-acrosomiale. Elle renferme une chromatine très compacte dans le noyau allongé et est coiffée par l'acrosome.

L'ADN du noyau existe sous la forme d'une hétérochromatine compacte grâce à la présence des protamines, des protéines hautement basiques riches en arginine et lysine. Au cours de la spermiogenèse, dans les spermatides en élongation, les histones de type somatique et leurs variants testiculaires sont remplacées par des protéines nucléaires de transition (TNPs) uniques au testicule qui sont à leur tour déplacées par des protamines.



**Figure 2 : La structure du spermatozoïde. (Johnson et Everitt, 2002)**

- a) Schéma d'un spermatozoïde
- b) Coupe sagittale de la tête, du collet et de la partie supérieure de la pièce intermédiaire
- c) Schéma de la pièce intermédiaire
- d) Coupe schématique de la pièce principale

Les protamines occupent des régions adjacentes de l'ADN et forment les liens intermoléculaires par des ponts disulfures. L'hétérochromatine permet ainsi aux spermatozoïdes de conserver leur génome dans un espace beaucoup plus restreint.

La partie postérieure de la membrane nucléaire forme une fossette d'implantation qui se lie au capitulum par de fins filaments (figure 2, b). Le capitulum, le site de terminaison des deux microtubules centraux du flagelle, est connecté, à son extrémité, aux fibres denses externes par des segments de colonnes. Le centriole sert à la formation initiale de l'axonème au cours de la spermiogenèse.

La pièce intermédiaire contient la gaine spiralée de mitochondries et l'axonème du flagelle composé de deux microtubules centraux et de neuf doublets de microtubules périphériques. Neuf fibres denses entourent la périphérie des doublets (figure 2, c).

Dans le segment principal du flagelle, les mitochondries sont remplacées par une gaine fibreuse qui contient deux colonnes longitudinales connectées par des structures transverses (figure 2, d). Les deux gaines columnnaires se connectent aux fibres denses externes 3 et 8. Les fibres denses externes se terminent vers l'extrémité du segment terminal, dans lequel se trouve la gaine fibreuse directement fixée aux microtubules externes 3 et 8. Le flagelle propulse le spermatozoïde grâce aux protéines motrices, les molécules de dynéine attachées aux doublets et liées à l'ATPase qui hydrolyse l'ATP comme source d'énergie pour faire glisser les microtubules.

### ***1.2.3 Les fonctions du spermatozoïde***

Les fonctions du spermatozoïde visent à réaliser la fécondation, c'est-à-dire la fusion d'un spermatozoïde et d'un ovocyte pour donner le zygote, la cellule souche à l'origine des différents tissus et organes (Thibault et Levasseur, 2001).

Afin de bien remplir son rôle, le spermatozoïde subit deux transformations préparatoires. La première est la capacitation qui, au niveau des trompes de Fallope, rend le spermatozoïde éjaculé apte à reconnaître la zone pellucide et à s'y lier via un récepteur spécifique. La capacitation s'accompagne généralement d'un changement de mobilité des spermatozoïdes qui deviennent hyperactifs. La deuxième transformation, la réaction acrosomiale (RA) est caractérisée par la fusion de la membrane plasmique du spermatozoïde et de la membrane externe de l'acrosome, avec exocytose du contenu de l'acrosome. Après cette réaction, le spermatozoïde peut franchir la zone pellucide et atteindre la membrane plasmique de l'ovocyte. La fécondation proprement dite inclut aussi deux étapes successives : 1) la liaison des membranes plasmiques des deux gamètes et leur fusion permettant au spermatozoïde de pénétrer l'ovocyte et, 2) l'activation de l'oeuf, phénomène complexe nécessaire à la mise en marche du premier cycle cellulaire qui s'achève par la première division de segmentation.

#### ***1.2.4 Apoptose au cours de la spermatogenèse et dans le sperme***

L'apoptose joue un rôle physiologique important dans le contrôle de la spermatogenèse normale (Blanco-Rodriguez, 1997 ; Oosterhuis et coll., 2000).

Au niveau de l'épithélium séminifère, elle contribue à l'homéostasie entre les cellules germinales et les cellules de Sertoli, et assure qu'un nombre constant de spermatocytes entre en méiose. À cause de l'apoptose, seulement 25% des spermatogonies A et 80% des cellules germinales, entre les spermatocytes de premier ordre et les spermatides, survivent.

Les spermatogonies établissent non seulement des liens structuraux et fonctionnels très étroits avec les cellules de Sertoli, mais elles sont aussi en contact avec la lame basale du tube séminifère. Au cours de l'apoptose, ce contact est régulé par des intégrines  $\alpha_3\beta_1$  ou  $\alpha_6\beta_1$  (Levy et Seifer-Akkin, 2001).

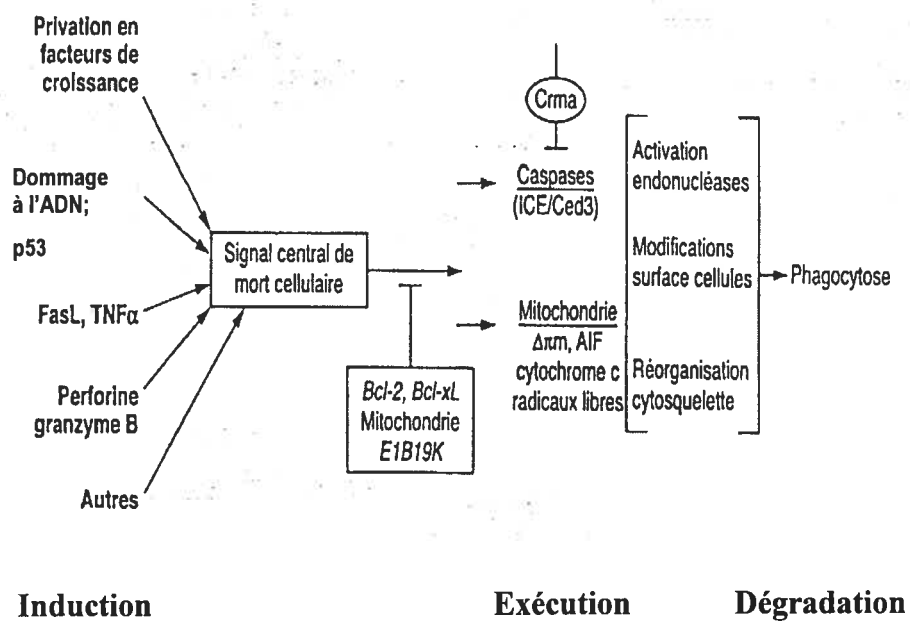


Le mécanisme de l'apoptose s'enclenche lorsqu'un signal de mort cellulaire arrive à la cellule. En guise de brève description générale, rappelons que l'apoptose comporte trois phases distinctes : l'induction, l'exécution et la dégradation (figure 3). La complexité de la phase d'induction tient, entre autres, à la diversité des signaux inducteurs (voir tableau 3), avec une prépondérance du système Fas/Fas ligand dans le cas de la spermatogenèse (Levy et Seifer-Aknin, 2001 ; Kierszenbaum., 2001 ; Lee et coll., 1997 ; Pentikainen et coll., 1999). Lorsque le Fas récepteur (glycoprotéine membranaire) présent à la surface des cellules de la lignée spermatique fixe le Fas ligand, il agit comme médiateur du signal apoptotique. Les mécanismes moléculaires responsables de la libération du ligand de Fas restent inconnus.

La mitochondrie joue un rôle central durant la phase d'exécution en libérant dans le cytoplasme trois procaspases, le cytochrome *c* (cofacteur des caspases) et le facteur d'induction de l'apoptose (AIF).

Lorsque l'AIF parvient au noyau, il induit les réactions conduisant à la fragmentation de l'ADN. Les radicaux libres et les ions calcium sont également impliqués dans le processus. Un contrôle s'effectue via la protéine Bcl-2 (action anti-apoptotique) liée à la surface externe de la membrane mitochondriale qui empêche le passage du cytochrome *c* dans le cytoplasme. À l'inverse, la protéine pro-apoptotique Bax facilite ce passage.

En réponse à l'activation des caspases, le processus apoptotique passe par une phase de clivage protéolytique de la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP), des lamines nucléaires, de l'actine, de la topoisomérase I et de la protéine kinase dépendante de l'ADN. Par la suite, il s'achève par la fragmentation de l'ADN et par la formation des corps apoptotiques. Finalement, la cellule fragmentée perd ses connexions intercellulaires et est détruite complètement par phagocytose. Notons que certaines spermatogonies et des spermatides qui ont survécu à l'apoptose forment des cellules géantes multinuclées.



**Figure 3 : Modélisation du processus apoptotique (Levy et Seifer-Aknin, 2001)**

**Tableau 3 : Inducteurs et inhibiteurs de l'apoptose<sup>1</sup>**

Inducteurs	Inhibiteurs
<u>Agents physiologiques</u> Famille du TNF (Ligand du Fas, TNF $\alpha$ ) «Transforming growth factor $\beta$ » Neurotransmetteurs Privation en facteurs de croissance Perte de contact avec la matrice extracellulaire Calcium Glucocorticoïdes  <u>Promoteurs de lésions cellulaires</u> Choc thermique Infections virales Toxines bactériennes Oncogènes <i>myc</i> , <i>rel</i> , <i>E1A</i> Suppresseur de tumeur p53 Cellules T cytotoxiques Oxydants, radicaux libres Radicaux libres Privation en nutriments Antimétabolites  <u>Agents thérapeutiques</u> Chimiothérapie Radiations gamma, UV  <u>Agents toxiques</u> Éthanol Peptide $\beta$ -amyloïde	<u>Agents physiologiques</u> Facteurs de croissance Matrice extracellulaire ligand de CD40 Acides aminés neutres Zinc Oestrogènes Androgènes  <u>Agents viraux</u> Adénovirus <i>E1B</i> Baculovirus <i>p35</i> Baculovirus <i>IAP</i> Virus de la variole <i>crmA</i> virus d'Epstein-Barr <i>BHRF1</i> , <i>LMP-1</i> virus de l'Herpes $\gamma$ 34.5  <u>Agents pharmacologiques</u> Inhibiteurs de la calpaïne Inhibiteurs de la cystéine protéase Promoteurs de tumeur : phénobarbital, PMA (phorbol myristate acétate), $\alpha$ -hexachloro-cyclohexane

<sup>1</sup>-Tiré de Levy et Seifer-Aknin, 2001

Des études chez des modèles animaux ont démontré l'importance du contrôle hormonal : l'administration d'oestradiol ou d'antagonistes de la GnRH, ainsi que la déplétion en testostérone, FSH ou LH peuvent induire l'apoptose au cours de la spermatogenèse (Levy et Seifer-Aknin, 2001).

Le processus de l'apoptose est relié aussi à la spermatogenèse pathologique (Shen et coll., 2002 ; Tesarik et coll., 1998). En cas de cryptorchidie, le volume et le poids des testicules sont diminués, et la spermatogenèse arrêtée. Bien que les cellules germinales soient en nombre normal à la naissance, elles commencent à disparaître à partir de l'âge de un an. Pendant ce processus, les spermatocytes et, par la suite les spermatides rondes, deviennent très sensibles à l'apoptose (Levy et Seifer-Aknin, 2001). Le taux de fragmentation de l'ADN dans les spermatogonies est significativement plus élevé que chez les sujets normaux. À l'âge adulte, les patients ayant souffert de cryptorchidie durant l'enfance et qui ont été traités chirurgicalement ont un volume testiculaire inférieur et un taux de FSH sérique supérieur à la normale, en dépit d'une bonne qualité de sperme.

Dans les cas d'arrêt de la maturation ou d'hypospermatogenèse, le nombre de cellules apoptotiques est augmenté. Cette observation a été rendue possible grâce au développement de techniques telles que « TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling » (TUNEL) et la cytométrie en flux qui permettent la mesure du taux de fragmentation de l'ADN dans les cellules germinales et dans les spermatozoïdes matures au niveau du sperme. Ces études ont permis de distinguer deux types d'azoospermies sécrétoires : dans le premier, on observe l'arrêt complet de la spermatogenèse au stade de spermatides rondes, et une fragmentation de l'ADN des spermatocytes de premier ordre et des spermatides rondes dans 80% des cellules examinées; dans le deuxième, il s'agit d'un arrêt incomplet de la spermatogenèse où quelques spermatides allongées (environ 1/3 des spermatocytes de premier ordre et quelque 15% des spermatides), contiennent de l'ADN fragmenté.

Une fragmentation de l'ADN plus massive est très souvent observée dans les spermatides et les spermatocytes chez les patients avec hypospermatogenèse ou arrêt complet de spermatogenèse. En clinique, il est impossible de distinguer si une spermatide contient ou non de l'ADN fragmenté, le risque associé à la technique ICSI est donc grave.

Le rôle de l'apoptose dans le sperme éjaculé demeure un sujet controversé. Cependant, l'utilisation de la technique TUNEL a aidé à détecter la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Les valeurs obtenues par la technique TUNEL montrent une bonne corrélation avec le pourcentage de spermatozoïdes ayant une sensibilité accrue de l'ADN à la dénaturation *in situ*. La technique TUNEL a un grand avantage par rapport à la microscopie électronique car les spermatozoïdes apoptotiques éjaculés et les cellules somatiques apoptotiques présentent les mêmes caractéristiques ultrastructurales : chromatine fragmentée ou condensée à la périphérie de l'enveloppe nucléaire, rupture ou disposition de la membrane nucléaire, des mitochondries en forme de ballon (Baccetti, 1996).

La combinaison des différentes techniques démontre la présence de cellules apoptotiques dans tous les échantillons de sperme, mais en pourcentages très variables selon la nature de la maladie : infection du tractus génital : 8% ; SIDA : 3 à 8% ; varicocèle : 1 à 10% ; globozoospermie : 10% ; cryptorchidie : 15 à 20% ; ataxie cérébelleuse : 15 à 20% ; patients stériles (causes inexplicées) : 25% ; séminome testiculaire : 50% ; comparativement à des donneurs fertiles : 0,1% (Levy et Seifer-Aknin, 2001). Gandini et coll. (1999) ont rapporté des taux de fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes de 2,5% chez les patients fertiles et de 10% chez les patients avec oligoasthénospermie, maladie de Hodgkin ou cancer testiculaire.

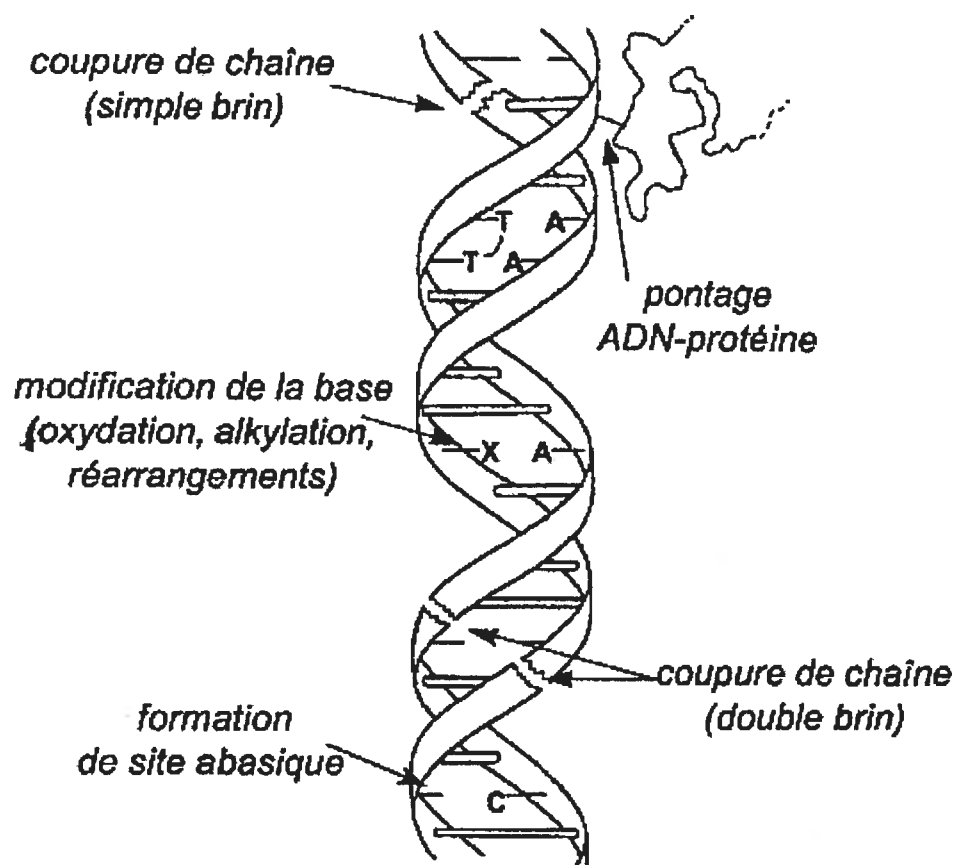
### 1.3 Les causes de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes.

Des dommages au matériel génétique de toutes les cellules sont omniprésents et semblent inévitables : ainsi, les processus de développement, le métabolisme et les divisions cellulaires entraînent une somme non négligeable de dommages à l'ADN (Snow, 1997).

Selon la source des agressions, l'ADN sera endommagé de différentes façons. Il existe quatre classes principales de dommages sur la double hélice : les cassures simple et double brin, les bases modifiées, les pontages ADN-ADN et ADN-protéines, et les sites abasiques (provenant d'une altération première du sucre ou d'une perte de base) (figure 4).

Depuis près de 20 ans, plusieurs laboratoires se sont intéressés aux causes et aux conséquences de la fragmentation de l'ADN des cellules de la lignée spermatique. Plusieurs auteurs ont rapporté que le taux de dommages à l'ADN des spermatozoïdes est relié à l'infertilité masculine (Ahmadi et Ng, 1999 ; Irvine et coll., 2000 ; Gandini et coll., 2000 ; Chen et coll., 2002 ; Host et coll., 2000 ; Ollero et coll., 2001). D'autre part, les techniques modernes basées sur l'ICSI risquent d'utiliser un spermatozoïde contenant de l'ADN gravement fragmenté. De même, la micro-injection des cellules de la lignée spermatique risque de causer l'échec de la fécondation, un développement embryonnaire anormal ou la mort de l'embryon (Sakkas et coll., 1998 ; Lopes et coll., 1998 ; Twigg et coll., 1998 a, b, c; Terada et coll., 2000).

Trois mécanismes ont été proposés pour expliquer l'origine de la fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes.



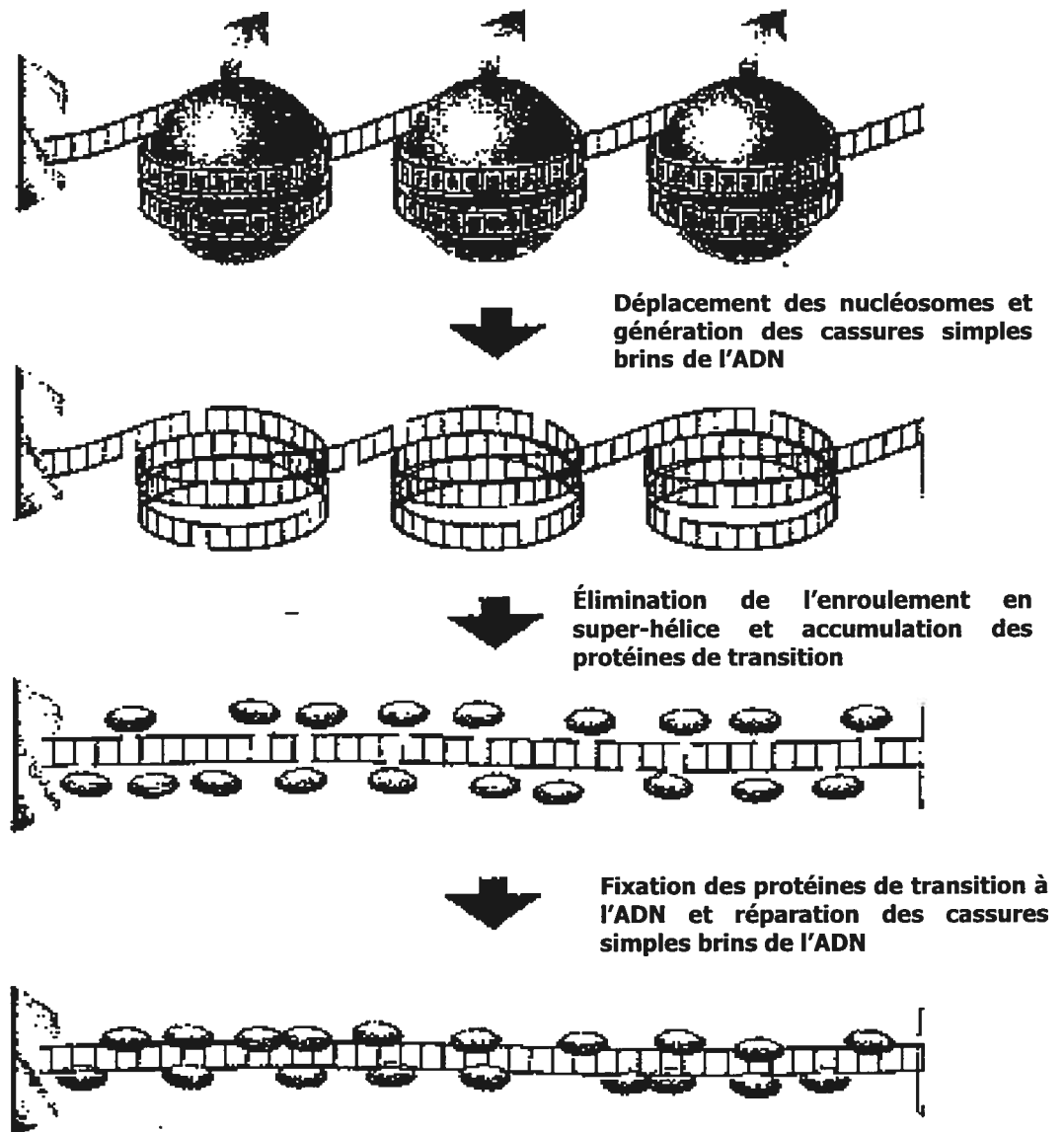
**Figure 4 : Principales classes de dommages de l'ADN (Voet et Voet, 1998)**

Le premier mécanisme implique l'apoptose comme processus entraînant des dommages à l'ADN ; il tient compte de la différence d'expression du système Fas à la surface des spermatozoïdes humains normaux versus anormaux.

Tandis que le sperme normal contient moins de 10% de spermatozoïdes exprimant le système Fas à leur surface, plus de 60% des échantillons oligospermiques, tératospermiques ou asthénospermiques contiennent plus de 10% de tels spermatozoïdes. Cela suggère un dysfonctionnement dans l'apoptose : soit que la capacité de processus apoptotique soit dépassée dans sa fonction d'éliminer les nombreuses cellules anormales, soit que le processus soit interrompu (Sakkas et coll., 1999a).

Le deuxième mécanisme est basé sur une possible anomalie de la transition des histones aux protamines et de la mise en place de protamines lors de l'étape de compaction de l'ADN durant la spermatogenèse (Sakkas et coll., 1999b). L'ADN topoisomérase II endogène agit pour décaténer l'ADN bicaténaire (figure 5). Elle participe au processus d'élimination de l'enroulement de l'ADN. Les nucléosomes de la chromatine de type somatique sont déplacés suite à la déstabilisation ou à la dégradation résultant des modifications post-traductionnelles des histones. L'activité nucléasique de la topoisomérase produit des cassures simples brins qui éliminent les super enroulements. L'accumulation de topoisomérase dans le noyau des spermatides allongées contribue à la réparation des dommages à l'ADN et promeut la condensation de l'ADN (Caron et coll., 2001). En conséquence, une constitution anormale de cette enzyme ou des conditions sub-optimales de fonctionnement peuvent causer une persistance de la fragmentation de l'ADN des cellules de la lignée spermatique. La corrélation entre le pourcentage de spermatozoïdes avec ADN fragmenté et le pourcentage de ceux présentant une composition en protamines défectueuses (révélée par coloration à la chromomycine A3) supporte cette hypothèse.





**Figure 5 : Hypothèse de l'action de la topoisomérase dans l'ADN surenroulé**

(Caron et coll., 2001)

De plus, une étude de Gorczyca et coll., (1993) a montré une corrélation positive entre le pourcentage de spermatozoïdes avec cassures simple brin de l'ADN, et le degré de sensibilité à la dénaturation de l'ADN. Ces propriétés des spermatozoïdes anormaux (probablement inaptes en terme de capacité reproductive) s'apparentent à celles des cellules somatiques apoptotiques. Les auteurs concluent donc que l'activation de l'endonucléase endogène, responsable des nombreuses cassures de l'ADN, est un indicateur de l'élimination fonctionnelle des cellules germinales défectueuses.

La production des radicaux libres représente la troisième cause possible de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Les SOR sont majoritairement produits par les leucocytes et par certains spermatozoïdes anormaux contenant un reste cytoplasmique volumineux. Plusieurs études attestent de leur capacité à induire une fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Selon certains auteurs, l'influence des SOR, en concentrations élevées, sur les spermatozoïdes représenterait une cause majeure d'infertilité masculine (Lopes et coll., 1998 ; Twigg et coll., 1998 a, b, c; Terada et coll., 2000).

#### **1.4 Substances oxygénées réactives dans les spermatozoïdes et dans le sperme**

L'analyse statistique de spermogrammes réalisés au cours des cinq dernières décennies suggère que la quantité et la qualité des spermatozoïdes tendent à diminuer avec les ans (Bujan et coll., 1996 ; Carlsen et coll., 1992 ; Aitken, 1999). Il a été suggéré que les SOR et le stress oxydatif puissent contribuer à une telle diminution (Aitken, 1994; Conte et coll., 1999 ; de Lamirande et coll., 1997a). En effet, des taux élevés de SOR ont été détectés dans quelque 25% des échantillons de sperme d'hommes qui consultent pour infertilité (Iwasaki et Gagnon, 1992 ; Zini et coll., 2001 ; Pasqualotto et coll., 2000 ; Shen et Ong, 2000 ; Shen et coll., 1999), phénomène souvent associé à une baisse de la mobilité et de la viabilité des spermatozoïdes (Iwasaki et Gagnon, 1992 ; de Lamirande et coll., 1995) ainsi qu'à une perte de la fertilité *in vivo* (Griveau et LeLannou 1997 ; Aitken, 1993; Baumer et coll., 2000 ; Sikka , 2001). La génération de quantités élevées de SOR induit la

peroxydation des lipides. Ceci entraîne des modifications de la fluidité et de la perméabilité de la membrane plasmique des spermatozoïdes (Aitken, Clarkson, 1987; Aitken, 2002 ; Alvarez et coll., 1987 ; Halliwell et Gutteridge, 1989), des dommages à leur ADN (Aitken et coll., 1998 ; Shen et coll., 1999 ; Hughes et coll., 1998 ; Alvarez et coll., 2002 ; Evenson et coll., 2002 ; Zini et coll., 2001), des pertes de fonction, et finalement la mort cellulaire.

D'autre part, des données récentes indiquent qu'une production de SOR en faibles concentrations joue un rôle physiologique dans le contrôle de fonctions normales des spermatozoïdes comme la capacitation, l'hyperactivation et la réaction acrosomiale (Aitken, 1995 ; Baker et coll., 2003; de Lamirande et coll., 1997 ; de Lamirande et Gagnon, 1999 ; de Lamirande et coll., 1998). Les études actuelles visent à mieux définir la dualité dans le rôle des SOR et du stress oxydatif dans la physiologie et les anomalies des spermatozoïdes.

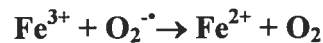
#### ***1.4.1 La nature et la formation des SOR***

Comme toutes les cellules qui, à travers l'évolution, ont survécu en conditions aérobiques, les spermatozoïdes produisent des SOR dont l'origine est le métabolisme de l'oxygène et de réactions enzymatiques (de Lamirande et Gagnon, 1999).

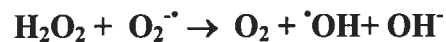
La facilité de formation de l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot -}$ ) résulte de la présence de deux électrons non appariés et de spins parallèles dans la structure électronique de l'oxygène qui prédispose la molécule à accepter un électron (Aitken, 1997). Étant donné sa courte vie (1 ms), il est relativement peu nocif. Par contre, sa réaction avec ses cibles produit des substances hautement toxiques et oxydantes comme le radical thiyle ( $RS^{\cdot}$ ). En captant deux protons, deux anions superoxydes dismutent spontanément ou enzymatiquement (superoxyde dismutase, SOD) en peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et oxygène.

Le peroxyde d'hydrogène produit par cette réaction est une molécule relativement stable et non chargée. Il peut donc facilement diffuser à travers la membrane cellulaire et, grâce à son potentiel oxydant élevé, participer au processus de peroxydation lipidique (de Lamirande, 1997). En présence de métaux de transition (e.g.  $\text{Fe}^{2+}$ ), le peroxyde d'hydrogène est transformé en radical hydroxyle, un initiateur puissant de la peroxydation lipidique.

Réaction de Fenton (1984) :



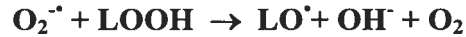
Ces deux réactions constituent la balance de Haber-Weiss :



Parmi les radicaux libres connus, le radical hydroxyle est un des plus réactifs. D'une demie-vie très courte, environ  $10^{-11}$  sec, il réagit immédiatement avec les molécules biologiques, pratiquement à l'endroit même de sa formation. Des métaux de transition comme le fer, le cobalt, le cuivre et l'aluminium accélèrent la réaction de Haber-Weiss à un point tel que, non seulement du peroxyde d'hydrogène mais aussi des lipoperoxydes y participent. *In vivo*, leur disponibilité est principalement nécessaire pour la génération de SOR et la peroxydation lipidique.

Notons que le fer et le cuivre peuvent exister à l'état libre dans le plasma séminal et sont donc disponibles pour maintenir le stress oxydatif. De plus, l'anion superoxyde endogène stimule la libération du fer de la ferritine intracellulaire et le réduit.

Le travail de Aitken et coll. (1989 a et b) a également montré que des hydroperoxydes lipidiques préexistants sont capables de générer des radicaux alkoxyles lipidiques :

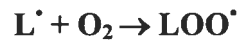
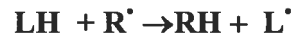


Les radicaux peroxydes lipidiques ( $\text{LOO}^{\cdot}$ ) et les peroxydes ( $\text{LOOH}$ ), générés par l'action de SOR, attaquent les phospholipides membranaires (Aitken, 1995 ; Jones et coll., 1979) Par conséquent, leurs produits de dégradation comme l'hydroxy-alkényle (Windsor et coll., 1993) et le dialdéhyde malonique (Jones et coll., 1979) affectent aussi la fonction du spermatozoïde (figure 6, Griveau, 1997).

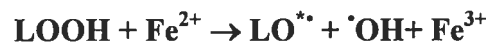
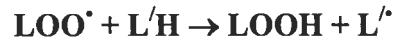
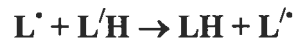
Les spermatozoïdes produisent aussi l'acide hypochloreux via l'oxydation de  $\text{Cl}^-$  par  $\text{H}_2\text{O}_2$ , réaction catalysée par une peroxydase (Aitken et coll., 1992 ; Aitken, 1995).

Des études récentes (Herrero et coll., 1999 ; Herrero et coll., 2000 ; Herrero et coll., 2001) indiquent que les fonctions du spermatozoïde peuvent être modifiées par l'oxyde nitrique ( $\text{NO}^{\cdot}$ ) généré par une NOSynthase.

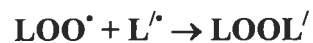
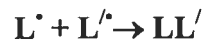
1. Étape initiale



2. Étape de propagation



3. Étape terminale



<b>LH et L'H</b>	<b>acides gras polyinsaturés</b>
<b>R<sup>•</sup> et R'<sup>•</sup></b>	<b>radicaux alkyles</b>
<b>LOO<sup>•</sup></b>	<b>peroxyde lipidique (radical peroxy)</b>
<b>LOOH</b>	<b>hydroperoxyde lipidique</b>

**Figure 6 : Trois étapes dans le processus de la peroxydation lipidique**  
(Griveau et LeLannou, 1997)

### 1.4.2 Les sources de SOR

Le sperme peut contenir plusieurs types de cellules susceptibles de générer des SOR: des leucocytes, des cellules germinales précurseurs (Ollero et coll., 2001) et des spermatozoïdes ; les polymorphonucléaires neutrophiles (granulocytes) représentant la source potentielle la plus importante (de Lamirande et Gagnon, 1999; Saleh et coll., 2002).

Les opinions diffèrent quant à l'impact de la leucocytospermie sur la fertilité masculine (Griveau et Le Lannou, 1999 ; Kowalski et coll., 1992 ; Plante et coll., 1994 ; Saleh et coll., 2002). Il serait négligeable *in vivo* mais important *in vitro* lors de la préparation de spermatozoïdes lavés, à cause de la production de SOR (Aitken, 1994). Retenons que plusieurs facteurs doivent être pris en compte : 1) l'état d'activation des granulocytes qui détermine leur capacité à produire des SOR ; 2) la présence de concentrations variables de piègeurs de SOR dans le liquide séminal ; et 3) les méthodes de préparation des spermatozoïdes qui peuvent être douces ou nocives.

Les spermatozoïdes morphologiquement normaux d'hommes infertiles sont probablement anormaux du point de vue biochimique car ils génèrent des niveaux significatifs de SOR (Iwasaki, Gagnon 1992, Plante et coll., 1994 ; Ford et coll., 1997). Toutefois, puisque seulement un tiers de ces SOR est relâché dans le milieu, et que la quantité est très faible comparativement à celle générée par les polymorphonucléaires activés, la présence des spermatozoïdes générant des SOR ne semble pas affecter la mobilité (Plante et coll., 1994). Certains contaminants environnementaux tel le plomb pourraient être responsables d'une génération accrue des SOR et de défauts fonctionnelles des spermatozoïdes. Quant aux spermatozoïdes normaux, ils produisent des niveaux extrêmement bas de SOR, tant dans le sperme frais qu'après centrifugation sur gradient de Percoll. Il est connu qu'un processus normal de génération de SOR survient au moment de la capacitation (de Lamirande et Gagnon 1993a, b, 1995a ; Aitken et coll, 1995). Au moins deux systèmes enzymatiques sont possiblement responsables de la génération de  $O_2^{\cdot -}$  dans le spermatozoïde. Une diaphorase (oxydo-réductase NADH - dépendante) d'origine

mitochondriale (Gavella et al. 1995 ; de Lamirande, Gagnon 1999) est probablement la source majeure des SOR produites par les spermatozoïdes de patients infertiles. D'autre part, le spermatozoïde posséderait aussi une oxydase au niveau de sa membrane plasmique (Griveau et De Lannou, 1997 ; Baumer et coll., 2000 ; Vernet et coll., 2001). Elle serait normalement activée seulement au moment de la capacitation et /ou de la réaction acrosomiale (de Lamirande et Gagnon 1999 ; de Lamirande et coll. 1997 a ; Aitken et coll., 1997).

Des études récentes indiquent que le radical  $\text{NO}^*$  peut aussi être toxique pour le spermatozoïde : à hautes concentrations, il diminue la mobilité des spermatozoïdes dans l'éjaculat (Zini et coll., 2001), alors que les inhibiteurs de la NOSynthase (NOS) peuvent prévenir cet effet. Le rôle des NOS chez l'humain reste cependant un sujet de controverse (Donnelly et coll., 1997).

#### ***1.4.3 Les piègeurs des SOR***

Le spermatozoïde et le plasma séminal contiennent des systèmes d'épuration pour contrecarrer ou réguler les effets des SOR. Ce sont les enzymes telles SOD, la catalase, la glutathion peroxydase (GXP) et la thiorédoxine réductase, ainsi que les antioxydants tels les vitamines A, E et C, l'ubiquinol-10, le glutathion, la thiorédoxine, la taurine et l'hypotaurine (Donnelly et coll., 1999 ; Dandekar et coll., 2002 ; Hughes, 1998 ; Pasqualotto et coll., 2000 ; Marik, 2000 ; Siciliano et coll., 2001).

La relation positive entre la mobilité des spermatozoïdes et leur activité SOD suggère que cette enzyme soit particulièrement importante pour ces cellules (de Lamirande et Gagnon, 1999). Toutefois, une autre étude rapporte que les niveaux les plus élevés d'activité SOD sont trouvés dans les spermatozoïdes présentant un reste cytoplasmique volumineux et produisant plus de SOR. L'activité SOD est négativement corrélée avec les paramètres de mobilité des spermatozoïdes et leur capacité de fusion avec



l'ovocyte (Aitken et al. 1996 a ; Hseih et coll.; 2002). D'ailleurs, une surexpression de la SOD et une faible production de  $O_2^{\cdot -}$  par les spermatozoïdes sont aussi trouvées dans certains cas d'oligozoospermie. Quant aux niveaux de catalase, le fait qu'ils soient extrêmement bas dans le spermatozoïde constitue une autre contradiction apparente car le  $H_2O_2$  est le plus souvent responsable de la perte de mobilité des spermatozoïdes (de Lamirande et Gagnon, 1999 ; Griveau et coll., 1995a). Une certaine complémentarité existe entre les piègeurs de SOR. Ainsi, les activités élevées de la SOD et de la GXP dans le plasma séminal pourraient compenser le niveau bas de  $\alpha$ -tocophérol dans la protection de la membrane plasmique contre le stress oxydatif (Surai et coll., 2000).

Les enzymes clés des défenses antioxydantes du spermatozoïde (SOD, la catalase et la glutathion peroxydase) peuvent aussi être inhibés par les SOR (de Lamirande et Gagnon 1999 ; Griveau et al. 1995a). Par exemple, le nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) est un cofacteur intracellulaire nécessaire à la production de SOR par le spermatozoïde, et à l'épuration des peroxydes par le système glutathion peroxydase/réductase. La portion peroxydase de ce système utilise le glutathion réduit, lequel est oxydé en glutathion disulfure, pour éliminer des peroxydes. Par contre, la portion réductase de l'enzyme régénère le glutathion réduit par une réaction impliquant le NADPH.

Les piègeurs de SOR sont présents dans tout le système reproductif masculin, et le stress oxydatif associé à la maturation des spermatozoïdes influence leurs niveaux. Par exemple, une protéine semblable à la glutathion peroxydase épидидymaire qui est sécrétée dans le fluide épидидymaire porcin se lie à la région acrosomiale du spermatozoïde et disparaît pendant la réaction acrosomiale. Les ARNm de la SOD et du système glutathion peroxydase/réductase sont exprimés différemment dans les diverses régions de l'épididyme du rat, ce qui suggère que le besoin en antioxydant puisse varier durant la maturation des spermatozoïdes (Zini et coll., 2001). La SOD est présente autant dans les cellules que dans le lumen d'organes tels que la prostate, les vésicules séminales et les testicules. Une déficience en zinc peut causer des dommages oxydatifs aux lipides, protéines et ADN

testiculaires de sorte que l'activité de la SOD et de la glutathion réductase augmente. L'âge influence aussi le niveau de certains piègeurs des SOR tandis que l'activité de la glutathion peroxydase (chez les oiseaux et le taureau) et de la SOD (chez le taureau) dans le sperme décroît avec le vieillissement.

Miranda-Vizuete et coll. (2001) ont récemment décrit un nouveau membre de la famille des thiorédoxines, localisé exclusivement dans le spermatozoïde. Il s'agit de la protéine Sptrx (« sperm-specific trx ») exprimée dans les testicules humains, spécifiquement dans les spermatides allongées et arrondies. Elle est capable de réduire les ponts disulfures en présence de NADPH et de thiorédoxine réductase. Puisque la réorganisation globale de ponts disulfures est nécessaire pour la stabilisation du cytosquelette du spermatozoïde durant la spermiogenèse, les auteurs proposent que la Sptrx joue un rôle comme facteur important à ce niveau. Puisque la thiorédoxine réductase et ses substrats sont importants contre le stress oxydatif dans les cellules (Ueda et coll., 1998), il est probable que la Sptrx participe à l'épuration de SOR dans les cellules de lignée spermatique.

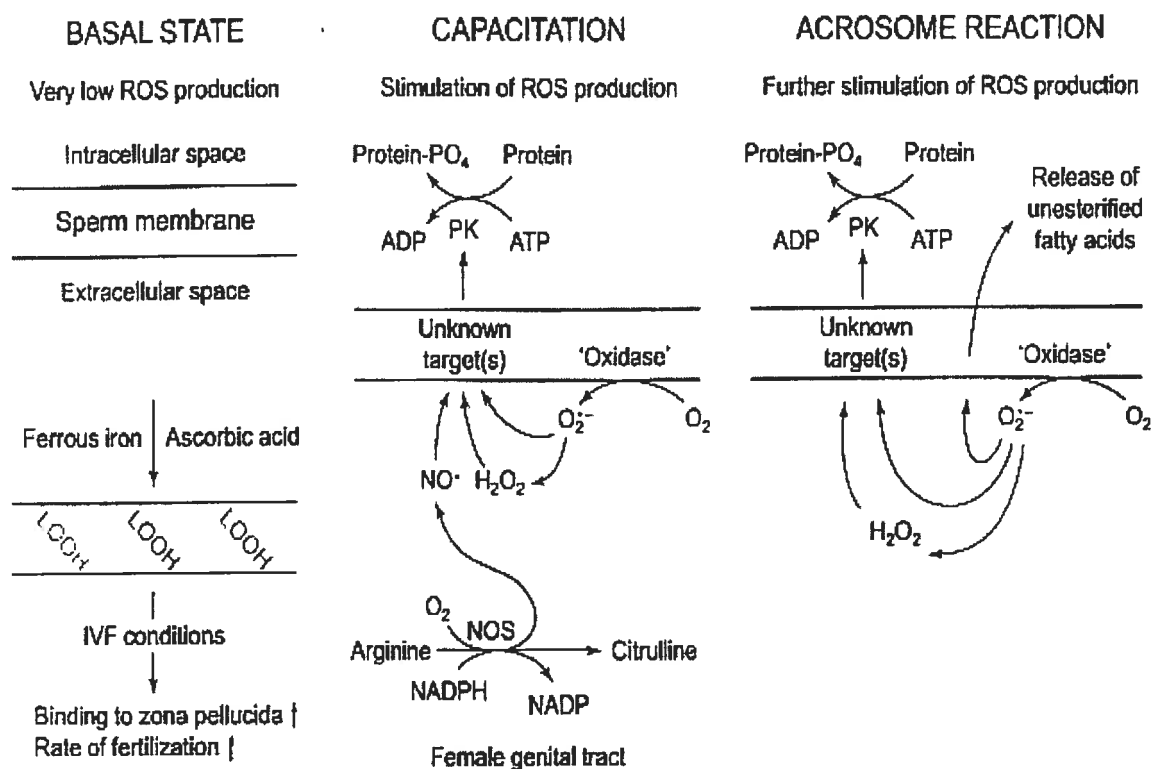
Plusieurs auteurs ont proposé des traitements *in vitro* ou *in vivo* utilisant des épurateurs de SOR dans le but d'accroître la fertilité masculine. Par exemple, la diminution de la mobilité du spermatozoïde due aux SOR générées par les spermatozoïdes eux-mêmes ou par les polymorphonucléaires neutrophiles peut être évitée par l'addition d'antioxydants tels que la catalase, le diméthylsulfide, le glutathion, la N-acétylcystéine, l'hypotaurine, la pentoxyfylline, la carnitine et le  $\alpha$ -tocophérol et la vitamine C (Kolvalski et coll. 1992 ; Baker et coll. 1996 ; Donnelly et coll., 1999, 2000 ; Omu et coll., 1999 ; Vicari et coll., 2002 ; Godeas et coll. 1997). De façon générale, alors que les résultats de certains tests des fonctions du spermatozoïde sont améliorés, aucun effet des traitements aux antioxydants sur la fertilité n'a été démontré (Aitken, 1999 ; Ford et Whittington, 1998 ; Martin-Du Pan et Sakkas, 1998).

#### ***1.4.4 Actions physiologiques et pathologiques des SOR***

Des SOR agissant en concentrations physiologiques modulent certains gènes et l'activité de protéines qui sont vitales pour la prolifération, la différenciation et les fonctions normales du spermatozoïde (Evenson et coll., 2002).

En conditions physiologiques, de faibles concentrations de SOR jouent un rôle clé pour le maintien des fonctions cinétique et fusogène du spermatozoïde. Ainsi, le peroxyde d'hydrogène participe à l'hyperactivation du spermatozoïde, phénomène nécessaire à sa migration dans le tractus génital féminin et à travers le cumulus oophorus. Des SOR influencent également la capacitation et la réaction acrosomiale (figure 7). À l'état basal, le spermatozoïde fertile ne produit que des quantités infimes de SOR ; cependant avec la capacitation, il commence à produire l'anion superoxyde grâce à une oxydase encore non caractérisée. Après la capacitation, les spermatozoïdes subissent la réaction acrosomiale dont l'induction stimule la production d'anion superoxyde et la libération d'acides gras non estérifiés de la membrane plasmique; le peroxyde d'hydrogène participerait aussi à la réaction acrosomiale (de Lamirande et Gagnon, 1999). Des SOR initient donc la peroxydation de lipides membranaires qui est nécessaire pour la fixation du spermatozoïde à l'ovocyte et son passage à travers la zone pellucide (Evenson et coll., 2002).

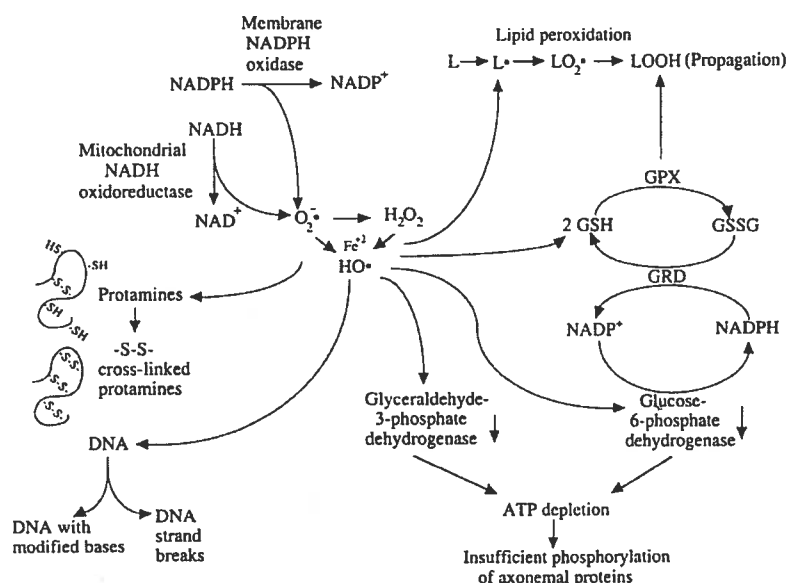
Alors que des quantités basses de SOR jouent un rôle physiologique dans les fonctions du spermatozoïde, des taux élevés exercent des effets pathologiques.



**Figure 7 : Rôles physiologiques des SOR dans la capacitation des spermatozoïdes et la réaction acrosomiale (de Lamirande, 1997)**

Toutes les composantes cellulaires tels les lipides, les protéines, les acides nucléiques et les sucres représentent des cibles potentielles pour les SOR. Le type et l'étendue des modifications dépendent non seulement de la nature et de la quantité de SOR, mais aussi du moment et de la durée d'exposition aux SOR (de Lamirande et Gagnon 1999). Les facteurs extracellulaires tels que la température, la tension en oxygène et la composition du milieu d'incubation exercent aussi une influence sur ce processus (Griveau et Le Lannou, 1997a). Dans le spermatozoïde, l'effet le mieux connu des SOR est la peroxydation des lipides (Sorey, 1997; Barroso et coll., 2000). Ils affectent aussi la production de NADPH (Aitken, 2003 ; de Lamirande, Gagnon 1992b; Griveau et al. 1995 a) l'ADN (Shen et al. 1997; Evenson et coll., 2002; Shen et coll., 2000) et la condensation de la chromatine (Zini et coll., 2001). En effet, les taux élevés de SOR sont impliqués dans trois sources d'anomalies structurales de la chromatine : l'activité anormale de la topoisomérase, l'apoptose et la nécrose (Evenson et coll., 2002).

Les taux élevés de SOR associés à des effets pathologiques résultent souvent de la contamination par des leucocytes et/ou par un déficit en antioxydants dans le plasma séminal ou dans le tractus reproductif. Un excès de SOR provenant des spermatozoïdes résulte quant à lui de la présence des restes cytoplasmiques volumineux (Gomez et coll., 1996) et des spermatozoïdes morphologiquement ou fonctionnellement anormaux (Agarwal et coll., 1999 ; Evenson et coll., 2002).



**Figure 8 : Les effets pathologiques des SOR sur le spermatozoïde** (de Lamirande, Gagnon, 1999)

Tels que résumé dans le schéma de la figure 8, une NADPH oxydase membranaire ou une NADH oxydo-réductase mitochondriale serait responsable de la génération de hauts niveaux de SOR dans les spermatozoïdes ; ces SOR attaquent les lipides de la membrane causant une réaction en chaîne de peroxydation des lipides. Les lipides peroxydés peuvent être réparés par la GXP, avec le glutathion comme substrat ; le glutathion oxydé qui en résulte est recyclé en GSH par la glutathion réductase dans une réaction qui utilise le NADPH, fourni par une réaction catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD). Les SOR causent une déplétion en GSH et inhibent la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et la G6PD. L'inhibition de ces enzymes entraîne une déplétion en ATP intracellulaire et arrête le mouvement des spermatozoïdes suite à une phosphorylation insuffisante des protéines axonémales. Les SOR peuvent aussi causer l'oxydation de l'ADN et l'hyper stabilité de la chromatine en favorisant la formation de ponts inter-moléculaires entre des protamines.

Le spermatozoïde est vulnérable au stress oxydatif à cause de l'expulsion du cytoplasme (contenant des antioxydants) pendant la maturation, et de la concentration élevée en acides gras polyinsaturés dans la membrane plasmique. En outre, l'excès de SOR produit dans le testicule et l'épididyme est nuisible aux spermatozoïdes qui y séjournent pendant une longue période sans protection par des antioxydants. Après l'éjaculation, le plasma séminal assure une bonne protection car il est riche en antioxydants (Evenson et coll., 2002).

D'autre part, des radicaux libres et  $H_2O_2$  sont impliqués dans l'induction de la mort des cellules germinales via l'apoptose ou la nécrose (Barroso, 2000). Rappelons que l'apoptose physiologique est nécessaire pour réguler la prolifération des cellules germinales qui pourrait s'associer au taux bas de SOR (Blanc-Layrac et coll., 2000). Toutefois, le taux élevé de SOR produit par des cellules de la lignée spermatique passant le tractus reproductif ou par des spermatozoïdes éjaculés est associé à l'oligozoospermie (Aitken et coll., 1992) ou à la dégradation de la chromatine des spermatozoïdes matures (Barroso et coll., 2000 ; Ollero et coll., 2001). Ces anomalies résulteraient de l'apoptose non régulée, à cause de l'exposition à un excès de SOR produits par des spermatozoïdes. Une étude a rapporté qu'en absence de plasma séminal, l'exposition aux SOR qui sont produits par des leucocytes et des spermatozoïdes pourrait induire l'apoptose ou la nécrose (Evenson et coll., 2002).

En résumé, les dysfonctions des spermatozoïdes reliées au stress oxydatif peuvent être une cause d'infertilité et de dommages au génome transmis à la descendance (Evenson et coll., 2002). C'est pourquoi certains auteurs soulignent l'importance d'évaluer la qualité du matériel génétique paternel, surtout dans les cas d'ICSI où la majorité des barrières empêchant la fécondation par un spermatozoïde anormal sont levées.

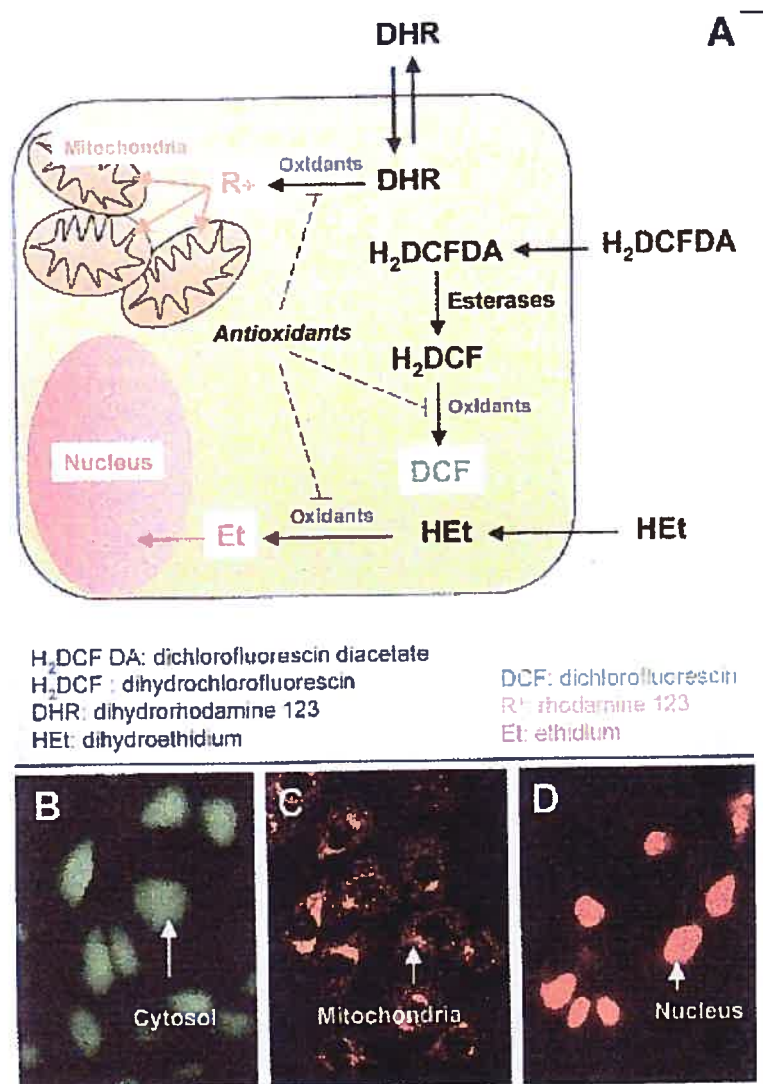
## 1.5 Méthodes de détection des SOR

Vu l'importance des SOR en biologie cellulaire, de nouvelles méthodes ont été développées afin de mesurer la génération de SOR dans les cellules vivantes intactes. Une telle technique utilise des sondes fluorescentes aptes à détecter des SOR intracellulaires. Ces sondes dérivent le plus souvent de la fluorescéine, de la rhodamine ou de l'éthidium (figure 9).

Afin d'augmenter la charge cellulaire, les sondes sont estérifiées (plus hydrophobes) ; à l'intérieur des cellules vivantes, des estérases hydrolysent la liaison ester et favorisent ainsi la séquestration des sondes. Après oxydation en composé fluorescent (figure 9), elles sont révélées par microscopie à fluorescence ou microscopie confocale, ou mesurées par fluorimétrie, par spectrofluorimétrie ou par cytométrie en flux. Des études récentes cherchent à modifier la méthode de détection de SOR par fluorescence en recherchant des nouvelles sondes ayant des propriétés uniques (Stephanson et coll., 2002 ; Pham et coll, 2000 ; Roychowdhury et coll., 2002 ; Hideg et coll., 2002) ou en développant de nouvelles techniques utilisant des sondes fluorescentes en microscopie confocale (Roychondhury et coll., 2002) et en spectrofluorométrie (Stephanson et all., 2002).

Les spermatozoïdes sont très sensibles aux dommages oxydatifs ; cela tient à l'abondance des acides gras polyinsaturés dans la membrane plasmique et à la faible concentration des piègeurs de radicaux libres à l'intérieur du cytoplasme. Certains chercheurs ont essayé de mesurer les SOR directement *in vivo* (Agarwal et coll, 1996; Ochsendorf, 1999), mais cela s'avère très difficile car les radicaux libres sont instables et de demi-vie très courte. L'utilisation du spectroscope à résonance paramagnétique électronique *in vivo* est impossible dans le cas de radicaux alcoxyle ou peroxyde à cause de la température très basse que cette technique exige.





**Figure 9 : Métabolisme et localisation subcellulaire de sondes détectant des SOR (A).** Microscopie en fluorescence des cellules en surcharge de H<sub>2</sub>DCFDA (**B**), DHR (**C**), Het (**D**) et traitées avec H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Negro-Salvayre, 2002).

R.J. Aitken et coll. (1992) ont, les premiers, proposé d'utiliser des essais de la chimiluminescence comme méthode indirecte pour détecter des SOR dans les spermatozoïdes. La luminescence est le phénomène par lequel certaines molécules portées à un état excité retournent à l'état fondamental en restituant une partie de l'énergie sous forme d'émission de lumière. On parle de la chimiluminescence lorsque l'énergie provient d'une réaction chimique très exergonique. Deux sondes sont souvent utilisées : le luminol (figure 10) et la lucigénine.

Dans les spermatozoïdes, le signal de chimiluminescence amplifié par le luminol est produit lorsque le luminol est oxydé dans la région acrosomiale (Kobayashi et coll., 2001). Le luminol subit la désoxygénation intracellulaire par des groupes hétérogènes de peroxydases des spermatozoïdes en présence du peroxyde d'hydrogène. Par contre, la lucigénine est oxydée dans la région extracellulaire par l'anion superoxyde (Aitken and Buckingham, 1992 ; Aitken et coll., 1992).

Les essais de chimiluminescence utilisant le luminol sont plus avantageux car ils permettent de mesurer le taux global de  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot -}$  et  $\cdot OH$  (Murphy et Sies, 1990; McKinney et coll., 1996) aux niveaux extracellulaire et intracellulaire (Sharma et Agarwal, 1996). Soulignons que la luminométrie est 100 000 fois plus sensible que la spectroscopie d'absorption et 1 000 fois plus que la fluorométrie.



## 2. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Les spermatozoïdes humains sont très sensibles au stress oxydatif, lequel peut mener à la perte de leur intégrité membranaire et de plusieurs de leurs fonctions, allant jusqu'à la mort cellulaire. Il est donc important d'identifier les causes possibles de génération de SOR et leurs effets sur la viabilité des spermatozoïdes et l'intégrité du matériel génétique. Nous avons étudié trois conditions susceptibles d'affecter les propriétés des spermatozoïdes via la génération de radicaux libres : le tabagisme, la cryopréservation des spermatozoïdes et l'exposition à un spermicide. Dans chaque cas, nous avons mesuré la production de radicaux libres par une technique de chimiluminescence utilisant le luminol comme sonde.

La fumée de cigarette contient un grand nombre de substances toxiques, elle est responsable de plusieurs maladies chez les fumeurs. Des auteurs ont récemment rapporté que le degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes des fumeurs serait plus élevé que celui des non fumeurs. Un des mécanismes possiblement impliqués dans cet effet nocif du tabagisme serait une production de substances oxygénées réactives. Nous avons donc testé l'hypothèse que la production de SOR par les spermatozoïdes serait plus grande chez les fumeurs que chez les non fumeurs.

Il est bien établi que la cryopréservation des spermatozoïdes cause une baisse de leur motilité, de leur pouvoir fécondant et, dans certains cas, la fragmentation de leur ADN. L'objectif était de vérifier si la congélation provoque la génération de SOR qui à leur tour causent des dommages à l'ADN. Nous voulions comparer les mesures de chimiluminescence de spermatozoïdes frais ou soumis à une congélation/décongélation sans milieu cryopréservatif, et vérifier l'intégrité de leur ADN par la technique TUNEL dans ces conditions.

Certains spermicides actuellement utilisés en contraception locale contiennent un détergent du type ammonium quaternaire, le chlorure de benzalkonium, comme principe

actif. Or, un homologue utilisé dans les préparations ophtalmiques peut induire la formation de SOR par les cellules conjonctives en culture. Il devenait important de déterminer si l'exposition des spermatozoïdes à ce type de détergent peut causer une production de SOR, laquelle pourrait augmenter le risque de transmettre un matériel génétique endommagé à l'ovocyte fécondé.

### **3. MATÉRIEL ET MÉTHODES**

#### **3.1 Sélection des sujets**

Les échantillons de sperme ont été obtenus du conjoint chez des couples consultant pour infertilité, et de donneurs de sperme recrutés par le Laboratoire d'andrologie de l'Hôpital Saint-Luc du CHUM. Pour les donneurs, le statut de fumeur ou de non fumeur était noté. Il s'agit d'hommes en bonne santé, testés négatifs pour l'hépatite B et le VIH (raisons de sécurité), âgés entre 18 et 39 ans et dont la fertilité était inconnue.

#### **3.2 Prélèvement du sperme**

Après 2 à 5 jours d'abstinence sexuelle, les sujets ont produit les échantillons de sperme par masturbation, avec recueil dans des contenants stériles. Après 30 minutes, temps nécessaire à la liquéfaction du sperme, un spermogramme a été effectué sur chaque échantillon selon les critères de l'OMS (OMS, 1992).

#### **3.3 Spermogramme**

La numération, le pourcentage de motilité et le pourcentage des spermatozoïdes à morphologie normale ont été évalués par microscopie, sur hématimètre. Dix  $\mu\text{L}$  de sperme ont été dilués dans 190  $\mu\text{L}$  d'une solution tampon phosphate (PBS, pH 7,4) à 37°C, et 10  $\mu\text{L}$  de cette suspension ont été mis sur l'hématimètre pour comptage au microscope. Lorsque la concentration des spermatozoïdes était basse ( $<10^6$ ), nous avons utilisé une dilution 1 :10 (décompte divisé par 2) ; à concentration de spermatozoïdes élevée ( $>10^7$ ), la dilution était de 1 :50 (décompte multiplié par 2,5).

### 3.4 Mesure de la production de substances oxygénées réactives (SOR)

Dans la première étude portant sur l'effet du fluorure de myristalkonium (MKF), chaque échantillon de sperme a été centrifugé (7 min à 500 x g), et le plasma séminal enlevé. Le culot a été resuspendu dans 2 mL de tampon PBS-Dulbecco 1 X (pH 7,4) (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), suivi d'une seconde centrifugation ; ce lavage des spermatozoïdes a été répété deux fois. Le culot de spermatozoïdes a été resuspendu dans 800 µL du tampon PBS-Dulbecco, séparé en quatre parties aliquotes, puis transféré dans la cuvette du luminomètre (röhren tubes, Starstedt) pour mesure de la chimiluminescence (comme témoin). Par la suite, un volume de 4 µL de luminol (25 mM, 5-amino-2,3-dihydro-1,4 phtalazinedione, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) a été ajouté à chaque cuvette gardée pendant 10 minutes à 37°C, à l'obscurité. Après avoir mesuré la chimiluminescence en présence de luminol (comme témoin), les mesures ont été répétées après l'ajout, séparément dans chacune des 4 cuvettes, de 4 µL de 1% MKF (Aromapharm, Dublin, Irlande), 5 µL de 10 mM NADPH (β-form, Sigma), 5 µL de 0,1 mM 12-myristate, 13-acétate de phorbol (PMA) (Sigma) et 5 µL de 10 mM N- formyl-méthyl-leucyl-phénylalanine (FMLP)(Sigma).

Dans la deuxième étude portant sur l'effet de la congélation, chaque échantillon de sperme a été divisé en deux parties aliquotes : une partie a été congelée dans l'azote liquide puis décongelée à 37°C pendant 10 min ; l'autre partie a été conservée à 37°C pendant le même temps. Par la suite, les échantillons frais et congelés/décongelés ont été centrifugés (7 min. à 500 x g), et le plasma séminal enlevé. Le culot a été resuspendu dans 2mL de tampon PBS puis lavé tel que décrit plus haut. Les culots de spermatozoïdes (frais ou congelés/décongelés) ont été resuspendus dans 200 µL du tampon PBS et transférés dans deux cuvettes du luminomètre et mis à la mesure de la chimiluminescence. La formation de SOR a été mesurée après l'addition de 4 µL de luminol (25 mM). Les autres produits, soit 5 µL de 10 mM NADPH et 4 µL de 1% MKF, ont été ajoutés successivement dans chacune des deux cuvettes du luminomètre (contenant des spermatozoïdes frais ou congelés/

décongelés). Le tampon PBS-Dulbecco (200  $\mu$ L) avec 4  $\mu$ L de luminol et 200  $\mu$ L de la suspension cellulaire, avant et après l'ajout de luminol, ont été utilisés comme témoin pour la mesure de chimiluminescence.

Le luminomètre «Turner Designs Model» mesure la chimiluminescence en mode d'intégration à 37°C. La production de SOR est exprimée en coups par seconde (cps) – une unité relative qui correspond au compte de photons et qui dépend du type de luminomètre. La chimiluminescence est exprimée par la moyenne des cps mesurés pendant 2 min.

### **3.5 Séparation des cellules du sperme sur gradient de Percoll**

Les solutions de Percoll (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, Canada) ont été préparées dans un tampon isotonique contenant 130 mM NaCl, 4 mM KCl, 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 14 mM fructose et 10 mM HEPES ajusté à pH 8,0 (de Lamirande et Gagnon, 1991). Deux couches de 200  $\mu$ L de Percoll à 95% et de 2 mL de Percoll à 65% ont été successivement disposées dans un tube stérile de 15 mL. Le sperme (1 à 3 mL) a été doucement versé dessus. La suspension a été centrifugée 30 min à 1300 x g. Le surnageant a été délicatement enlevé et le culot suspendu dans 200  $\mu$ M d'une solution contenant 1 mM NaHCO<sub>3</sub> et 0,34 M sucrose.

### **3.6 Mesure de la chimiluminescence des cellules du sperme induite par NADPH**

Après séparation sur gradient de Percoll, la chimiluminescence des spermatozoïdes a été préalablement mesurée en absence et en présence de luminol. Chaque partie aliquote (200  $\mu$ L) d'un échantillon a été séparément incubée avec 1  $\mu$ L de Triton X-100 (Sigma) ou avec 2  $\mu$ L de MKF à 0,001% pendant 10 min ; puis, la chimiluminescence a été mesurée en ajoutant 10 mM NADPH (isomère  $\beta$ ) (Sigma).



### 3.7 Mesure de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes par la technique TUNEL

Plusieurs échantillons de sperme évalués par chimiluminescence ont également été examinés par la technique TUNEL. Des aliquotes des spermatozoïdes (environ  $10^6$ ) ont été fixées à la formaline 1% durant 30 minutes, centrifugées à 10 000 x g pendant 4 min, et le surnageant retiré. Le culot a été resuspendu dans 100 µl de tampon TdT 1X (25 mM  $\text{CoCl}_2$ , 0,1% Triton X-100, tampon TdT 5X, pH 7,4) pendant 10 min afin de perméabiliser les spermatozoïdes. Après centrifugation (4 min à 10000 x g), le culot a été resuspendu dans 100 µl de tampon TdT 1X contenant de la biotine 16-désoxyuridine triphosphate (dUTP-biotine) (Roche) et 10 U de désoxynucléotidyle transférase terminale (TdT) (Roche) à pH 7,4. Une incubation de 60 minutes à 37°C permet à la TdT d'incorporer la dUTP-biotine à toutes les extrémités 3'OH des fragments d'ADN. Après lavage dans le tampon TN (30 mM Tris, 300 mM NaCl, pH 7,4), la suspension a été centrifugée (4 min à 10 000 x g) et le surnageant enlevé. En chambre noire, le culot de spermatozoïdes a été resuspendu dans 100 µl de tampon AP (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4) contenant de la streptavidine (Gibco Invitrogen Corporation, Ontario, Canada) couplée à 3 ou 4 molécules d'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) (1:50). Après incubation pendant 60 min à 37°C, les spermatozoïdes ont été centrifugés, le culot lavé avec du tampon AP puis conservé à 4°C dans ce tampon jusqu'à son analyse en cytométrie en flux (Sergerie et coll., 2000; Gorzyka et coll., 1993). Les lectures ont été effectuées à une longueur d'onde d'excitation de 450 nm et d'émission de 523 nm. Le tracé du contour de la population cible de spermatozoïdes a été établi sur le graphique des intensités de la lumière diffractée dans l'axe («forward scatter» ; taille de la cellule) en fonction de celle diffractée à 90° («side scatter» ; contenu cytoplasmique). Un total de 10 000 événements a ainsi été recueilli pour chaque analyse.

Lors de l'analyse en cytométrie en flux, l'utilisation d'un témoin négatif (non traité avec la TdT) et d'un témoin positif (préalablement traité 30 minutes avec une DNase 1,

sans RNase ) a servi à valider la technique (Sergeie, M. et coll., 2000), les résultats devant s'insérer entre ces deux valeurs extrêmes.

### **3.8 Préparation de frottis et coloration des spermatozoïdes selon Papanicolaou**

Un frottis de dix  $\mu\text{L}$  de sperme a été préparé sur une lame, séché à l'air, fixé dans l'alcool/éther (1 : 1) pendant 5 à 15 min et séché à nouveau. Par la suite, le frottis a été successivement immergé dans l'alcool 95%, 80%, 70%, 50% et puis dans l'eau distillée. Après incubation dans l'hématoxyline (Harris ou Mayer) pendant 2 min, le frottis a été rincé 3 à 5 min sous l'eau courante, immergé successivement dans l'alcool 50%, dans l'ammoniaque et dans l'alcool 70%, 80%, 95%. Après incubation dans l'Orange-6 pendant 2 min, il a été immergé 3 fois dans l'alcool 95%, incubé pendant 2 min dans EA-65, immergé à nouveau 3 fois dans l'alcool 95% et gardé dans l'alcool absolu pendant 1 min. Après fixation dans l'alcool/toluène (1 : 1) pendant 1 min et, finalement, dans le toluène pendant 5 min, le frottis a été enrobé dans de l'Eukitt.

Les photos des spermatozoïdes colorés par la technique de Papanicolaou ont été prises avec une caméra *Qimaging* sur microscope *Zeiss Axiophot* au département de pathologie et de biologie cellulaire de l'Université de Montréal.

### **3.9 Coloration des spermatozoïdes pour la mise en évidence de leur viabilité**

#### ***3.9.1 Coloration des spermatozoïdes avec l'éosine et la nigrosine***

Les spermatozoïdes ont été colorés avec l'éosine (éosine Y de Sigma à 1% dans  $\text{H}_2\text{O}$  distillée) et la nigrosine (Sigma) à 10% dans  $\text{H}_2\text{O}$  distillée selon les instructions du manuel de l'OMS. Un volume (10  $\mu\text{L}$ ) de sperme a été mélangé à deux volumes (20  $\mu\text{L}$ ) d'éosine; après 30 secondes, trois volumes (30  $\mu\text{L}$ ) de nigrosine ont été ajoutés puis bien mélangés. Une goutte du mélange a été étalée sur lame et séchée à l'air. Le décompte des

spermatozoïdes vivants (incolores) et morts (colorés en rouge) a été effectué sous microscope optique à des grossissements de 400X, 600X ou 1 000X.

### ***3.9.2 Coloration des spermatozoïdes avec le colorant de Sternheimer***

Le colorant de Sternheimer a été préparé à partir de 3 volumes d'une solution A (violet cristal 3,0 g ; éthanol 95% : 20 ml; oxalate d'ammonium : 0,8 g ; eau distillée : 80 ml) et de 9 volumes d'une solution B (safranine O : 0,25 g ; éthanol 95% : 10 ml ; eau distillée : 90 ml). Un volume (50 µL) de sperme frais a été mélangé à un volume (50 µL) de colorant et étalé sur la lame. Après séchage, les spermatozoïdes ont été observés sous microscope à des grossissements de 600X ou 1 000X. Pour chaque échantillon de sperme, nous avons compté cent spermatozoïdes, en différenciant les spermatozoïdes vivants (bleus) et les spermatozoïdes morts (rouges). À l'aide de cette technique de coloration, tel que décrit dans la section **Résultats**, il est possible de différencier les spermatozoïdes immobiles mais vivants, de ceux qui sont morts.

Les photos des spermatozoïdes colorés avec l'éosine/nigrosine et avec le colorant de Sternheimer ont été prises avec avec une caméra *Qimaging* sur microscope *Zeiss Axiophot* au département de pathologie et de biologie cellulaire de l'Université de Montréal et avec une caméra *Nikon Coolpix 900* sur microscope *LEICA OMR* installé au laboratoire de pathologie de l'Hôpital Saint Luc du CHUM.

### ***3.9.3 Coloration des spermatozoïdes avec l'éosine/nigrosine et avec le colorant de Sternheimer après traitement au fluorure de myristalkonium.***

Après avoir effectué le spermogramme, 6 échantillons de sperme ont servi à évaluer l'effet du MKF sur la viabilité des spermatozoïdes selon les colorations à l'éosine/nigrosine et de Sternheimer. Six parties aliquotes de 50 µL de chaque échantillon de sperme ont été

traitées sans MKF ou après l'addition de 0,5  $\mu$ L ou 5  $\mu$ L de MKF à 0,1%. Après incubation pendant 10 minutes, la mobilité des spermatozoïdes a été examinée au microscope (10  $\mu$ L de la suspension dilués dans 190  $\mu$ L de tampon HAM-F10 (Invitrogen Canada Inc., Ontario) et les aliquotes ont ensuite été colorées avec chacun des deux colorants.

### 3.10 Extraction et analyse de l'ADN des spermatozoïdes

Un volume de 5-10 mL de sperme (correspondant à  $10^8$  -  $10^9$  spermatozoïdes) a été centrifugé 10 minutes à 5 000 x g, et le culot suspendu dans 0,8 mL de tampon de lyse contenant 30 mM de citrate de sodium (pH 7,0), 6 M de thiocyanate de guanidine, 0,5% de N-lauroylsarcosine, 0,02% de protéinase K et 0,3 M de  $\beta$ -mercapto-éthanol. Après incubation pendant une nuit, 1,6 mL d'isopropanol étaient ajoutés à la suspension et le tube agité doucement par inversion jusqu'à précipitation de l'ADN sous forme de « balle de coton ». L'ADN a été récupéré sur tige puis lavé avec 1 mL d'éthanol à 70%, séché sous azote puis dissous dans 1 mL de tampon Tris 10 mM (pH 8,1) contenant 1 mM EDTA. Le dosage de l'ADN a été effectué par spectrophotométrie à 260 nm. L'ADN (~5  $\mu$ g dans 16  $\mu$ L) extrait a été déposé sur gel d'agarose à 0,8% et soumis à une électrophorèse dans un tampon Tris-taurine (pH 0,9) contenant 0,25 M EDTA. L'ADN a ensuite été visualisé sous UV après coloration au bromure d'éthidium.

### 3.11 Statistiques

La compilation et l'analyse des résultats a été réalisée avec les logiciels *EXCEL*, *Sigmastat 2.0* (Jandel Corporation, San Raphael) et *Statistica 6,0* (Stat Soft, Inc).

Les résultats de mesures de la chimiluminescence ont été analysés par le test t pairé de Student et par le test des paires de Wilcoxon pour les données appariées. La dépendance entre paramètres des spermogrammes et la chimiluminescence, ainsi que la comparaison

des deux méthodes de coloration des spermatozoïdes ont été effectuée par la régression linéaire. Nous avons accepté  $p < 0,05$  comme seuil de signification pour tous les tests.

## 4. RÉSULTATS

### 4.1 Production de SOR par les cellules du sperme

Debbasch et coll. (1999) ont récemment rapporté que le chlorure de benzalkonium utilisé comme agent de préservation dans des préparations oculaires est délétère pour des cellules conjonctivales en culture. Un des mécanismes pouvant expliquer la toxicité de ce détergent implique la formation de radicaux libres, avec augmentation de la fragmentation de l'ADN. Ces auteurs ont observé que de faibles concentrations de chlorure de benzalkonium induisent l'apoptose avec production de peroxyde d'hydrogène et de l'anion superoxyde; à fortes concentrations, le détergent provoque la mort cellulaire par nécrose.

Ce phénomène étant susceptible de se produire avec divers types cellulaires, nous avons examiné l'effet d'un nouvel agent spermicide, le MKF, sur la chimiluminescence émise par les spermatozoïdes en présence de luminol. Le MKF est un ammonium quaternaire avec une chaîne de 14 carbones. Il s'agit du sel de fluor d'un des homologues du benzalkonium. Il agit sur la bicouche lipidique de la membrane des spermatozoïdes, la rendant plus perméable et causant la mort cellulaire suite au débalancement osmotique. Notre laboratoire a observé que le MKF, en concentration sublétales, pourrait causer une augmentation de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes tel que mesurée par la technique TUNEL (G. Laforest, résultats non publiés). En outre, nous avons noté que cet effet du MKF sur l'ADN est plus marqué dans le cas des spermatozoïdes de patients consultant pour infertilité que chez des donneurs de sperme.

Afin de déterminer si le MKF agit comme inducteur d'une voie de production de SOR (ceci pouvant expliquer la fragmentation de l'ADN), nous avons mesuré la production des SOR dans des échantillons de sperme exposés au MKF.

Les essais de chimiluminescence ont été effectués en présence de luminol comme sonde car ces conditions permettent de mesurer le taux global de  $H_2O_2$ ,  $O_2^{\cdot -}$  et  $\cdot OH$ , tant au niveau extracellulaire qu'intracellulaire (Vernet et coll., 2001, Kobayshi et coll., 2001). Le

signal de chimiluminescence final représente la somme intégrale des signaux partiels générés par chaque spermatozoïde ou autre cellule dans la fraction correspondant au culot de sperme après centrifugation.

Afin de maximiser le signal de chimiluminescence (très faible avec certains spécimens), nous avons utilisé le nombre maximal de spermatozoïdes que chaque échantillon permettait. Ceci a été avantageux surtout dans les cas d'oligozoospermie. Chaque échantillon servant de son propre témoin (cellules avec luminol versus celles-ci après l'addition de MKF), des tests statistiques pairés ont pu être faits.

#### ***4.1.1 Mesure de la chimiluminescence basale des cellules du sperme***

Les caractéristiques des 14 échantillons de sperme évalués dans cette étude sont présentées dans le tableau 4. Les volumes de sperme variaient de 0,6 mL à 4,3 mL, la numération de  $12 \times 10^6/\text{mL}$  à  $142 \times 10^6/\text{mL}$ , et le pourcentage de mobilité de 30% à 90%.

L'analyse des droites de régression (valeurs non présentées) n'a montré aucune relation statistiquement significative entre la chimiluminescence en présence de luminol (tableau 5) et les caractéristiques des spermogrammes (tableau 4). Cette absence de corrélation, particulièrement avec la numération et la mobilité, tient au fait que les leucocytes et les spermatozoïdes avec reste cytoplasmique sont des sources beaucoup plus productrices de SOR que les spermatozoïdes normaux (voir discussion).

Tel que présenté au tableau 5, le bruit de fond (luminol dans le PBS) pour la mesure de la chimiluminescence était toujours inférieur à 0,03 cps. Quant aux suspensions de spermatozoïdes dans le PBS, un cas seulement (échantillon 8B) a donné une lecture très différente de celle du bruit de fond, signifiant une auto-chimiluminescence.

**Tableau 4 : Caractéristiques des échantillons de sperme utilisés dans l'étude des effets du MKF**

Échantillons de sperme <sup>1</sup>	Volume mL	Numération (10 <sup>6</sup> /mL)	Mobilité % grade <i>a</i>
1B	2,7	23	90
2B	1,7	62	70
3B	4,3	62	70
4B	4,1	75	70
5B	1,9	117	80
6B	3,1	12	70
7B	2,3	142	90
8B	0,6	65	90
9B	3,5	17	60
10B	2,7	86	85
11B	3,8	47	90
12B	1,3	21	30
13B	2,0	45	70
14B	4,0	12	40

1 : Les échantillons de sperme ont été obtenus du conjoint chez des couples consultant pour infertilité



**Tableau 5 : Mesure de la chimiluminescence des cellules du sperme,  
en présence et en absence de luminol**

Échantillons de sperme	Chimiluminescence (cps <sup>1</sup> )		
	PBS avec luminol	Fraction de spermatozoïdes sans luminol	Fraction de spermatozoïdes avec luminol
1B	0,003	- <sup>2</sup>	111,8
2B	0,003	-	187,1
3B	0,003	-	0,148
4B	0,004	0,030	0,042
5B	0,004	0,036	0,023
6B	0,013	0,010	3,524
7B	0,019	0,014	0,152
8B	0,001	0,431	4187
9B	0,020	0,031	118,7
10B	0,016	0,021	0,464
11B	0,016	0,019	0,218
12B	0,016	0,028	0,041
13B	0,029	0,014	29,15
14B	0,029	0,005	0,619

1 : coups par seconde ; 2 : mesure non effectuée

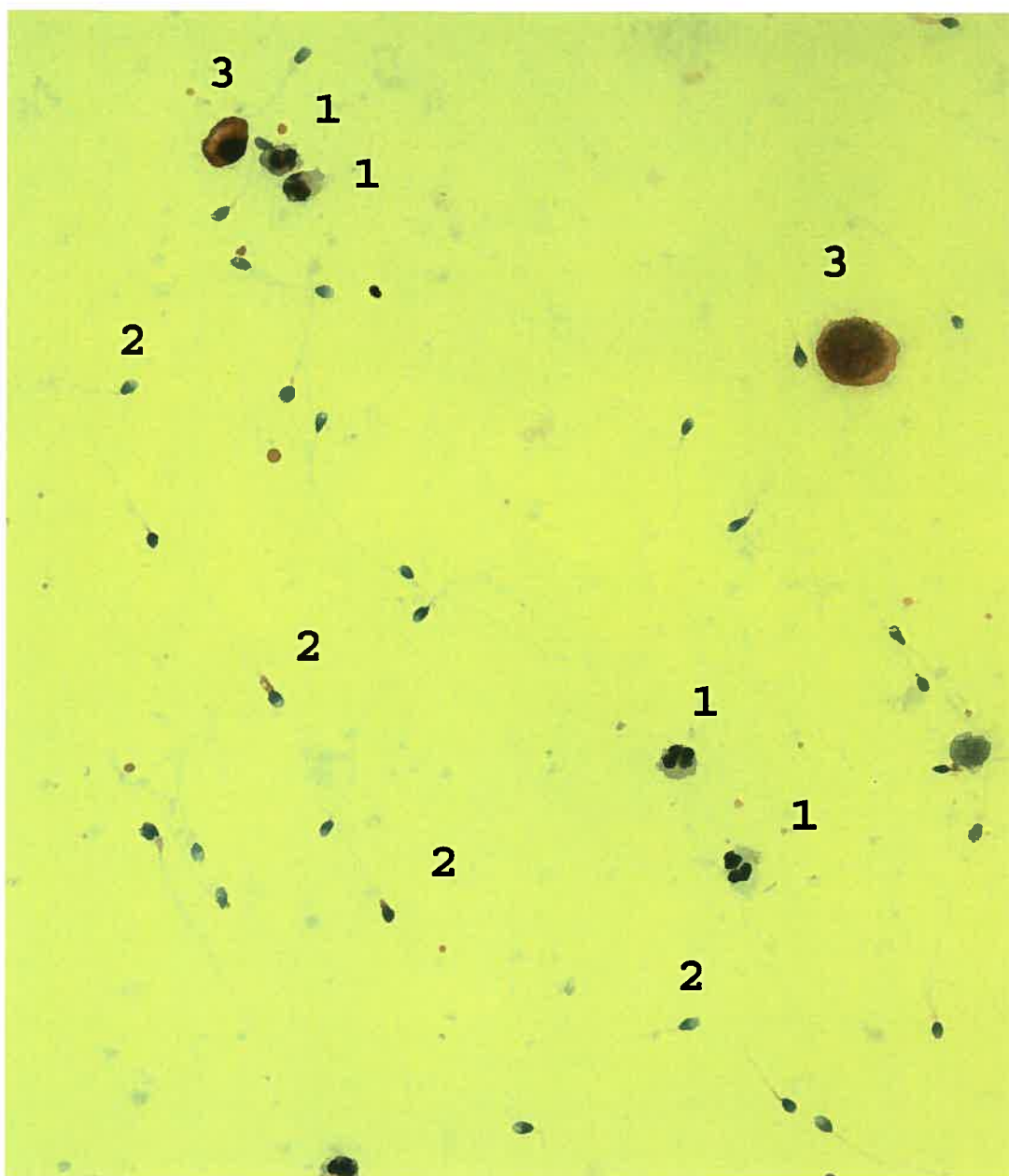
En présence de luminol, la chimiluminescence de la fraction contenant les spermatozoïdes était significativement plus grande qu'en absence de luminol ( $p = 0,004$ ; test des paires de Wilcoxon). Nous avons remarqué que cinq spécimens (1B, 2B, 8B, 9B et 13B) montraient une émission de chimiluminescence très importante en présence de luminol. Puisque le sperme peut contenir diverses cellules capables de générer des SOR, nous les avons recherchées par analyse cytologique des 14 échantillons étudiés (tableau 6).

Dans l'échantillon 8B, l'analyse cytologique a révélé la présence d'un très grand nombre de granulocytes ( $20 \times 10^6/\text{mL}$ ), de quelques lymphocytes et monocytes, ainsi qu'un nombre élevé de cellules de la lignée spermatique tels que des spermatides avec grand reste cytoplasmique, des spermatocytes et des spermatogonies (figure 11). Ces cellules étaient présentes en moins grand nombre dans les échantillons 1B, 2B, 9B, 13B. Par ailleurs, aucun des échantillons de sperme ne contenait assez de bactéries pour que leur présence puisse être détectée par observation directe au microscope. Les échantillons contenant des PMN montraient tous des valeurs élevées de chimiluminescence. Les autres échantillons ne contenaient pas de PMN, et leur plus faible chimiluminescence serait causée par la présence de restes cytoplasmiques volumineux ou de spermatozoïdes immatures.

**Tableau 6 : Examen cytologique du sperme après coloration par la technique de Papanicolaou**

Échantillons de sperme	PMN <sup>1</sup> 10 <sup>6</sup> /mL	RCV <sup>1</sup>	CGP <sup>1</sup>
1B	5	++	+
2B	2	++	++
3B	0	+	0
4B	0	0	0
5B	0	0	0
6B	0	++	+
7B	0	+	0
8B	20	+++	+++
9B	4	++	++
10B	0	0	+
11B	0	+	0
12B	0	0	0
13B	1,6	0	0
14B	0	+	0

1. PMN: polymorphonucléaires ; RCV: reste cytoplasmique volumineux ; CGP: cellules germinales précurseurs;  
 2. Échelle : 0 = absence ; + = rare ; ++ = fréquent ; +++ = très abondant.



**Figure 11 : Analyse cytologique de l'échantillon de sperme 8B coloré par la technique de Papanicolaou. Granulocytes (1), spermatozoïdes (2), cellules immatures de la lignée spermatique (3). Grossissement 400X. Photo prise avec une caméra *Qimaging* sur microscope *Zeiss Axiophot*.**

#### ***4.1.2 Mesure de la chimiluminescence des cellules du sperme, induite par le PMA***

Pour évaluer la génération induite de SOR, nous avons mesuré la chimiluminescence en présence de PMA. Avec sa structure semblable à celle du diacylglycérol, le PMA déclenche la cascade des phosphoinositides et active la protéine kinase C. Contrairement au FMLP, le PMA ne peut servir de marqueur cellulaire spécifique car il induit la production de SOR par les PMN et les spermatozoïdes (Saleh et coll., 2002). L'addition de PMA a provoqué une augmentation significative de la chimiluminescence par rapport aux valeurs témoins ( $p = 0,003$  ; test des paires de Wilcoxon) (tableau 7). Cette analyse a porté sur 6 des 14 échantillons, soit ceux pour lesquels nous disposions d'un volume de sperme suffisant pour faire toutes les analyses prévues.

**Tableau 7 : Effet du PMA sur la chimiluminescence de la fraction contenant les spermatozoïdes<sup>1</sup>**

Échantillons de sperme	Chimiluminescence (cps)	
	Fraction de spermatozoïdes avec luminol	Fraction de spermatozoïdes avec luminol en présence de PMA
7B	0,152	1,591
9B	118,7	144,4
10B	0,464	6,868
11B	0,218	0,948
12B	0,041	0,154
14B	0,619	3,042

**1 :** Les tracés d'enregistrement de la chimiluminescence induite par PMA, en fonction du temps sont présentés en annexe 1

#### ***4.1.3 Mesure de la chimiluminescence des cellules du sperme, induite par le NADPH***

Étant donné qu'une oxydase membranaire dépendante du NADPH serait en partie responsable de la génération de SOR dans les spermatozoïdes (Aitken et coll., 1997; de Lamirande et Gagnon 1999), nous avons examiné l'effet de l'isomère  $\beta$  du NADPH, une source d'électrons, sur la chimiluminescence.

Dans une première série d'expériences, l'isomère  $\beta$  du NADPH (500  $\mu$ M) a été ajouté aux cellules (du sperme) lavées dans du PBS et incubées avec le luminol pendant 10 min ; la chimiluminescence a été immédiatement mesurée (tableau 8). Dans cette étude portant sur 6 échantillons de sperme ne contenant pas un nombre mesurable de PMN, l'addition de NADPH n'a causé aucune augmentation significative de chimiluminescence ( $p = 0,074$  ; test des paires de Wilcoxon) (tableau 8).

Dans une deuxième série d'essais, l'isomère  $\beta$  du NADPH (500  $\mu$ M) a été ajouté aux spermatozoïdes perméabilisés par un traitement aux détergents Triton X-100 selon Aitken et coll. (1997) ou MKF; nous avons observé une augmentation significative de la chimiluminescence comparativement à la luminescence basale. Dans cette expérience, les spermatozoïdes ont été séparés du plasma séminal sur gradient de Percoll (de Lamirande et Gagnon, 1992a et b) ou lavés dans un tampon contenant 1mM NaHCO<sub>3</sub> et 0,34 M sucrose (Aitken et coll., 1997). Puisque le premier essai a démontré que les mesures de chimiluminescence étaient semblables, tous les échantillons suivants ont été préparés par lavage dans 1 mM NaHCO<sub>3</sub> et 0,34 M sucrose (voir annexe 2 ; sujet 1N). Afin de perméabiliser les spermatozoïdes, nous avons utilisé le Triton X100 à 1% et le MKF à 0,001% (tableau 9 ; annexe 2).

**Tableau 8 : Effet du NADPH sur la chimiluminescence de la fraction contenant les spermatozoïdes intacts**

Échantillons de sperme	Chimiluminescence (cps)	
	Fraction spermatozoïdes, avec luminol	Fraction spermatozoïdes, avec luminol, en présence de NADPH
3B	0,152	0,210
4B	0,042	0,092
5B	0,023	0,057
6B	3,524	3,210
7B	0,152	0,210
14B	0,619	0,659



L'addition du MKF (0,001%) a augmenté la réponse de chimiluminescence 7 fois plus que celle en ajoutant de Triton X100 (voir annexe 2 ; sujet 1N). En conséquence, seulement le MKF (0,001%) a été utilisé pour les essais suivants. Trois des quatre échantillons examinés ont donné une forte augmentation de la chimiluminescence induite par NADPH ( $p = 0,0313$  ; test des paires de Wilcoxon) (tableau 9 ; annexe 2). Seulement, dans un cas (3N) présentant un grand nombre de cellules de la lignée spermatique (surtout des spermatides), le NADPH a causé une baisse de la chimiluminescence des cellules perméabilisées (tableau 9 ; annexe 2). En conclusion, notre étude a confirmé que la perméabilisation des spermatozoïdes augmente l'effet du NADPH sur la génération de SOR.

Cette conclusion est confirmée par une autre étude dans laquelle nous avons mesuré la chimiluminescence de cellules du sperme congelé/décongelé, en ajoutant du NADPH (voir la section 3.2). Il appert que la congélation/décongélation contribue à perméabiliser la membrane plasmique. Dans cette expérience portant sur 29 échantillons de sperme, nous avons mesuré la chimiluminescence des cellules fraîches et congelées/décongelées. Bien que l'addition du NADPH aux cellules fraîches n'ait montré aucun changement de chimiluminescence ( $p = 0,1$  ; test des paires de Wilcoxon), nous avons observé une faible augmentation de la chimiluminescence ( $p < 0,001$  ; test des paires de Wilcoxon) en ajoutant du NADPH aux cellules congelées/décongelées.

**Tableau 9 : Effet du NADPH sur la chimiluminescence des spermatozoïdes perméabilisés<sup>1</sup>**

Échantillons de sperme					Chimiluminescence (cps)		
Volume mL	Numération x 10 <sup>6</sup> /mL	Mobilité % grade <i>a</i>	Viabilité % vivant		Spermatozoïdes, avec luminol	Spermatozoïdes, avec luminol et MKF Sans NADPH	Avec NADPH
1N 2	80	60	60		0,20	0,24	2,62
2N 3,2	35	70	40		0,06	0,02	1,09
3N 3,4	75	60	60		892	706	218
4N 10,9	72	70	60		0,19	0,12	1,14

**1 :** Les tracés d'enregistrement de la chimiluminescence induite par NADPH en fonction du temps sont présentés dans l'annexe 2

#### ***4.1.4 Effet du MKF sur la production de SOR***

Le MKF, un agent spermicide à l'étude dans notre laboratoire, fait partie des détergents de type ammonium quaternaire. Debbasch et coll. (1999) ont étudié les effets de plusieurs ammonium quaternaires (chlorure de benzalkonium, bromure de benzododécinium et cétrimide) utilisés en ophtalmologie et observé qu'ils pourraient induire la production de SOR par des cellules conjonctivales humaines en culture, lesquelles à leur tour causent la fragmentation de l'ADN. Nous avons donc proposé l'hypothèse que le MKF puisse agir de la même façon sur spermatozoïdes humains.

Le MKF à 0,001% n'a causé aucune augmentation de la chimiluminescence (section 3.1.3). À une concentration de 0,01 % de MKF, nous avons observé une diminution de la chimiluminescence ( $p = 0.004$  ; test des paires de Wilcoxon) (tableau 10).

**Tableau 10 : Effet du MKF sur la chimiluminescence de la fraction contenant les spermatozoïdes.**

Échantillons de sperme	Chimiluminescence (cps)	
	Fraction spermatozoïdes, avec luminol	Fraction spermatozoïdes avec luminol, en présence de MKF à 0.01%
1B	111,8	76,850
2B	187,1	19,634
4B	0,042	0,036
5B	0,023	0,014
6B	3,524	0,029
7B	0,152	0,024
8B	4187	0,017
13B	29,150	0,322
14B	0,619	0,032

## 4.2 Mesure de la production de SOR par les spermatozoïdes frais et congelés, de fumeurs et de non fumeurs

La cryopréservation des spermatozoïdes cause une baisse de leur motilité et de leur pouvoir fécondant ; par contre, l'ajout de cryoprotecteurs atténue cet effet. Or, une technique récente d'évaluation de l'infertilité masculine, basée sur la stabilité de la chromatine des spermatozoïdes (SCSA, « Sperm Chromatin Structure Assay ») utilise du sperme conservé dans l'azote liquide, sans cryoprotecteur. Ce mode de conservation risque d'induire un biais dans les résultats d'analyse par SCSA car les spermatozoïdes de tous les sujets ne répondent pas nécessairement de la même façon à la congélation, surtout dans les cas d'hommes infertiles.

Dans la présente étude, nous avons étudié l'influence de la congélation du sperme dans l'azote liquide, sans cryoprotecteur, sur la production de SOR par des spermatozoïdes. Les spermatozoïdes de deux parties aliquotes de chaque échantillon de sperme (frais et congelé/décongelé) ont été lavés par centrifugation dans le tampon de PBS, et la production de SOR a été mesurée par chimiluminescence en présence de luminol. L'effet de l'addition de NADPH et de MKF a aussi été évalué (tableaux 11, 12).

La relation entre le nombre des spermatozoïdes dans des échantillons différents et leur émission de chimiluminescence était examinée par la méthode de régression linéaire. Que toutes les valeurs soient utilisées ou en rejetant la valeur extrême de 279 cps, une corrélation très faible était obtenue. (figure 12, tableau 11).

Les mesures de la chimiluminescence des spermatozoïdes frais (non congelés) (tableaux 11) ont confirmé les résultats obtenus dans l'étude précédente (tableaux 8). Ainsi, l'addition du NADPH n'a pas provoqué d'augmentation significative de la chimiluminescence ( $p = 0,1$  ; test des paires de Wilcoxon) (tableau 11, figure 13) ; par contre, l'ajout de MKF a réduit considérablement le compte de photons (tableau 11,

**Tableau 11 : Mesure de la chimiluminescence émise par les cellules à l'état frais du sperme d'hommes fumeurs et non fumeurs, et effet du NADPH et du MKF**

Sujet <sup>2</sup>	Chimiluminescence (cps) <sup>3</sup>				
	Numération (x 10 <sup>6</sup> /ml )	Sans luminol	Avec luminol	Avec luminol	
				NADPH	NADPH/MKF
F02	40	0,108	36,141	30,150	6,522
F05	11	0,009	0,107	0,108	0,155
F06	5,3	0,025	0,410	0,350	0,111
F11	0,8	0,033	0,002	0,004	0,023
F12	20,8	0,021	4,600	1,242	0,971
F15	4,1	0,011	0,201	0,129	0,046
F17	7,8	0,027	0,088	0,060	0,040
F23	19,9	0,022	6,823	4,982	1,023
F24	264	0,005	22,29	19,157	6,350
NF25	49	0,068	3,955	3,426	0,751
NF26	64,8	0,011	0,177	0,175	0,029
P01	16,8	0,320	595,2	420,46	279,313
P02	50	0,008	0,891	0,769	0,210
P03	44	0,007	52,22	43,69	1,629
P04	33	0,011	13,44	9,629	0,554
P05	38,4	0,013	8,047	7,352	0,576
P06	6	0,015	0,198	0,161	0,032
P07	57	0,029	4,503	3,696	0,024
P08	49,5	0,064	1,077	1,048	0,616
P09	16,5	0,059	3,656	3,060	0,398
P10	124	0,046	25,360	20,50	0,594
P11	25	0,014	2,518	1,377	0,668
P12	60	0,015	37,890	29,59	1,475
P13	86	0,008	0,128	0,217	0,147
P14	24	0,024	3,935	3,030	0,228
P15	124	0,021	0,213	0,575	0,358
P16	88,5	0,163	0,511	0,496	0,089
P17	45	0,015	3,667	3,254	1,062
P18	82,5	0,019	4,374	4,197	3,205

2 F: sperme de fumeurs; NF: sperme de non fumeurs ; P : sperme de patients anonymes consultant pour infertilité

3 Les traces d'enregistrement de la chimiluminescence en fonction du temps sont présentées en annexe III

**Tableau 12 : Mesure de la chimiluminescence émise par les cellules du sperme congelé d'hommes fumeurs et non fumeurs et effet du NADPH et du MKF**

Sujet <sup>4</sup>	Chimiluminescence (cps) <sup>5</sup>				
	Frais avec luminol	Congelés sans luminol	Congelés avec luminol	Congelés avec luminol	
				NADPH	NADPH/MKF
F02	36,141	0,023	7,020	5,504	1,744
F05	0,107	0,017	0,027	0,039	0,063
F06	0,410	0,005	0,012	0,039	0,075
F11	0,002	0,121	0,020	0,037	0,033
F12	4,600	0,050	0,024	1,002	1,119
F15	0,201	0,036	0,005	0,078	0,073
F17	0,088	0,020	0,020	0,026	0,051
F23	6,823	0,040	0,021	0,029	0,042
F24	22,29	0,013	6,380	5,514	2,700
NF25	3,955	0,013	0,015	0,036	0,052
NF26	0,177	0,018	0,003	0,043	0,081
P01	595,2	0,000	0,040	0,887	0,122
P02	0,891	0,018	0,012	0,049	0,023
P03	52,22	0,067	0,009	0,669	0,130
P04	13,44	0,015	0,008	0,025	0,017
P05	8,047	0,010	0,028	0,105	0,124
P06	0,198	0,005	0,015	0,019	0,042
P07	4,503	0,011	0,003	0,040	0,035
P08	1,077	0,008	0,014	0,144	0,042
P09	3,656	0,014	0,029	0,059	0,064
P10	25,36	0,032	0,023	0,290	0,093
P11	2,518	0,055	0,023	0,056	0,116
P12	37,89	0,013	0,026	0,245	0,054
P13	0,128	0,026	0,021	0,225	0,110
P14	3,935	0,052	0,025	0,215	0,312
P15	0,213	0,041	0,019	0,264	0,800
P16	0,511	0,163	0,003	0,062	0,075
P17	3,667	0,071	0,014	0,029	0,047
P18	4,374	0,016	0,007	0,072	0,118

4 Identification des sujets correspond à celle qui est utilisée dans le Tableau 11.

5 Les traces d'enregistrement de la chimiluminescence en fonction du temps sont présentées en annexe III.

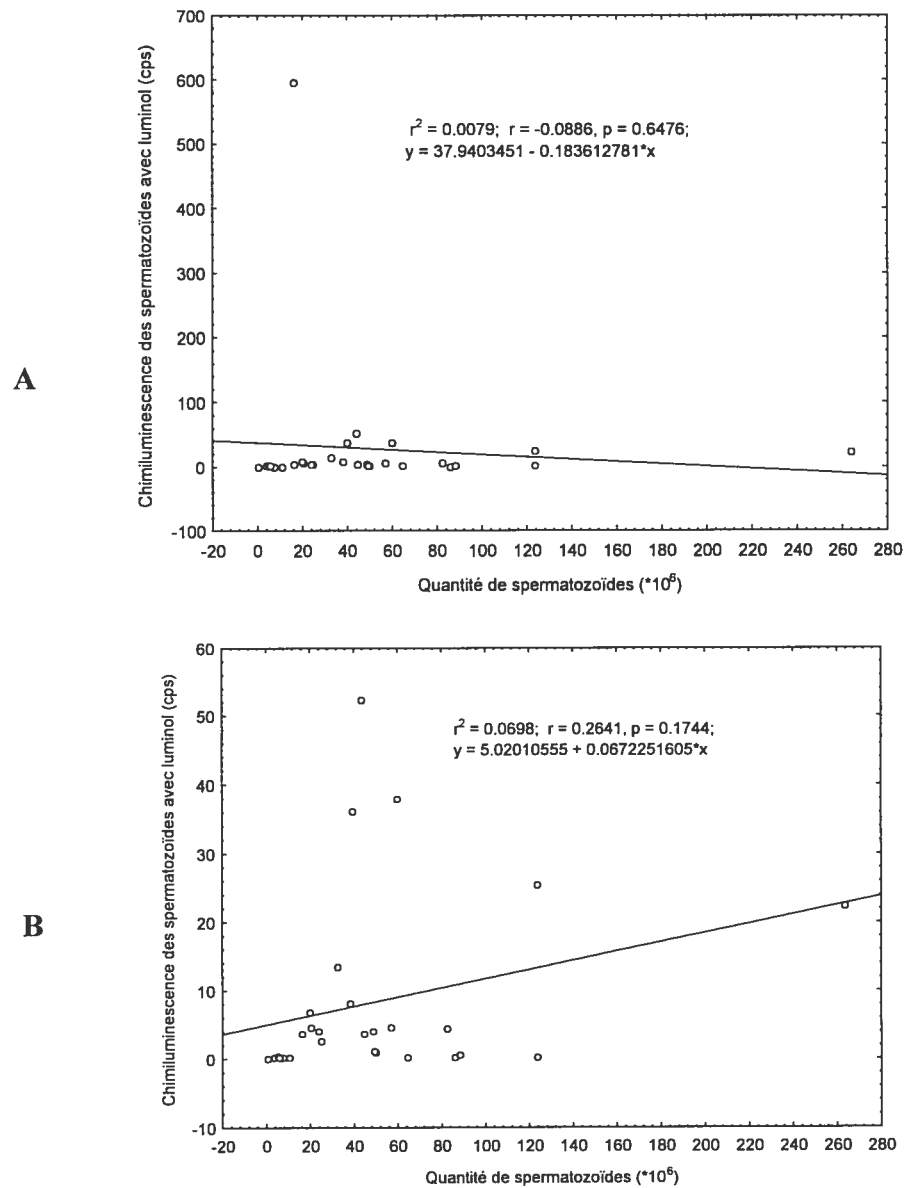
figure 13). Dans quelques cas (F02, F24, P01, P03, P04, P10, P12) nous avons également observé une valeur élevée de chimiluminescence en présence de luminol, causée par la présence de PMN ou cellules immatures. Les analyses statistiques sur le sperme frais ont été effectuées en excluant ces 7 valeurs extrêmes (figure 13).

De façon très contrastante, dans 27 cas sur 29, les spermatozoïdes et autres cellules du sperme ayant subi la congélation émettent une chimiluminescence en présence de luminol qui n'est pas différente de la chimiluminescence sans luminol, alors que dans deux cas (F02 et F24), la baisse de chimiluminescence était importante (tableau 12). La valeur importante de chimiluminescence en présence de luminol dans les deux cas F02 et F24 pourrait résulter de la survie de cellules capables de générer des SOR. L'analyse statistique a été effectuée par le test des paires de Wilcoxon en excluant ces deux valeurs extrêmes (figure 14).

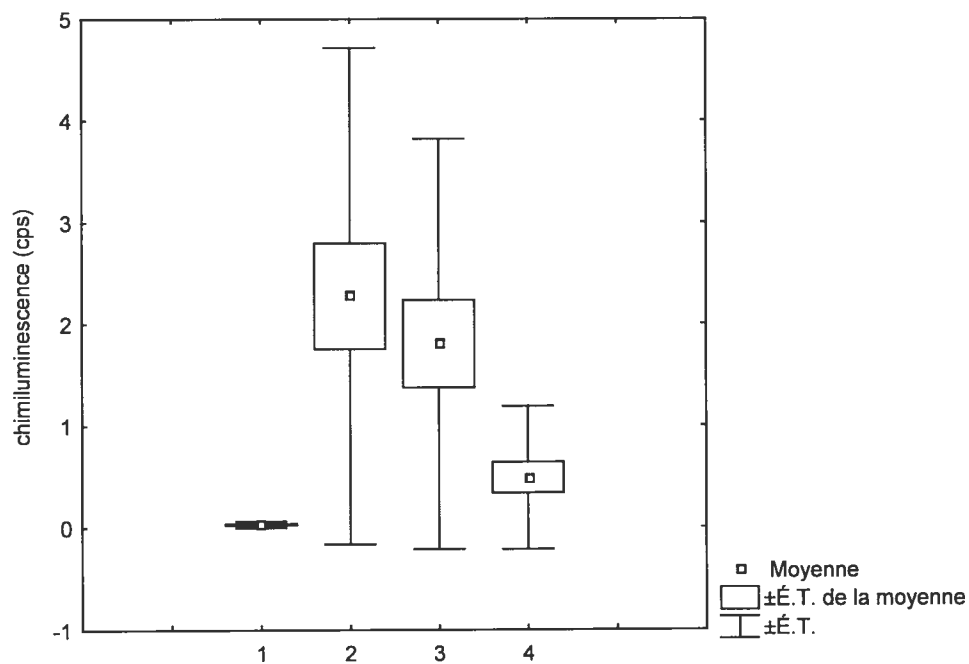
Dans le cas de cellules congelées/décongelées, nous avons observé une augmentation significative de la chimiluminescence ( $p < 0,001$  ; test des paires de Wilcoxon) après l'ajout du NADPH (tableau 12, figure 14).

L'ajout de MKF après le NADPH n'a pas changé de façon significative les valeurs de chimiluminescence des cellules du sperme ( $p = 0,524$  ; test des paires de Wilcoxon) (tableau 12 ; figure 14) ; ceci indique que ce détergent ne stimule pas la production de SOR.



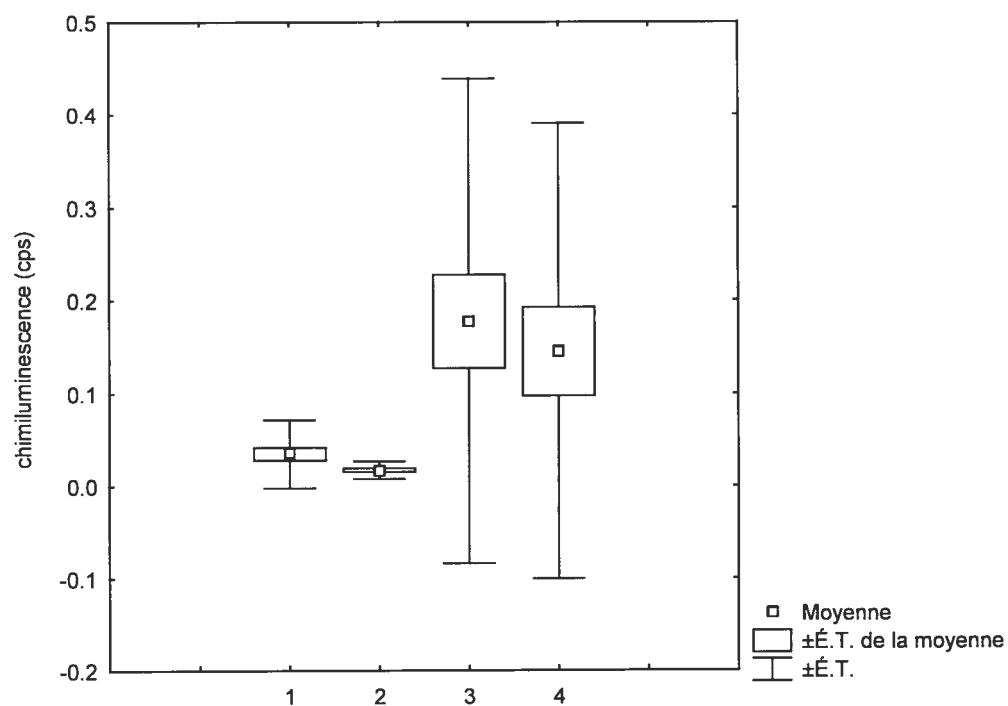


**Figure 12 : Absence de dépendance entre la quantité de spermatozoïdes ( $10^6$ ) et leur chimiluminescence. (A) : Graphique incluant toutes les valeurs;  $R = -0,09$ ;  $N = 29$ ;  $p = 0,65$ . (B) : Graphique excluant une valeur extrême (sujet P01, leucocytospermie)  $R = 0,2$ ;  $N = 28$ ;  $p = 0,17$ ;**



**Figure 13 : Effet du NADPH et du MKF sur la chimiluminescence des cellules du sperme frais, après lavage**

1 : Cellules seules, sans luminol  
 2 : Cellules avec luminol (2 vs 1 :  $p = 0,003$ )  
 3 : Cellules avec luminol et NADPH (3 vs 2 :  $p=0,1$ )  
 4 : Cellules avec luminol, NADPH et MKF (4 vs 3 :  $p=0,001$ )  
 Test des paires de Wilcoxon. É.T. : écart-type



**Figure 14 : Effet du luminol, du NADPH et du MKF sur la chimiluminescence des cellules du sperme congelé /décongelé.**

1 : Cellules congelées, sans luminol

2 : Cellules congelées avec luminol (2 vs 1 :  $p=0,232$ )

3: Cellules congelées avec luminol et NADPH (3 vs 2 :  $p<0,001$ )

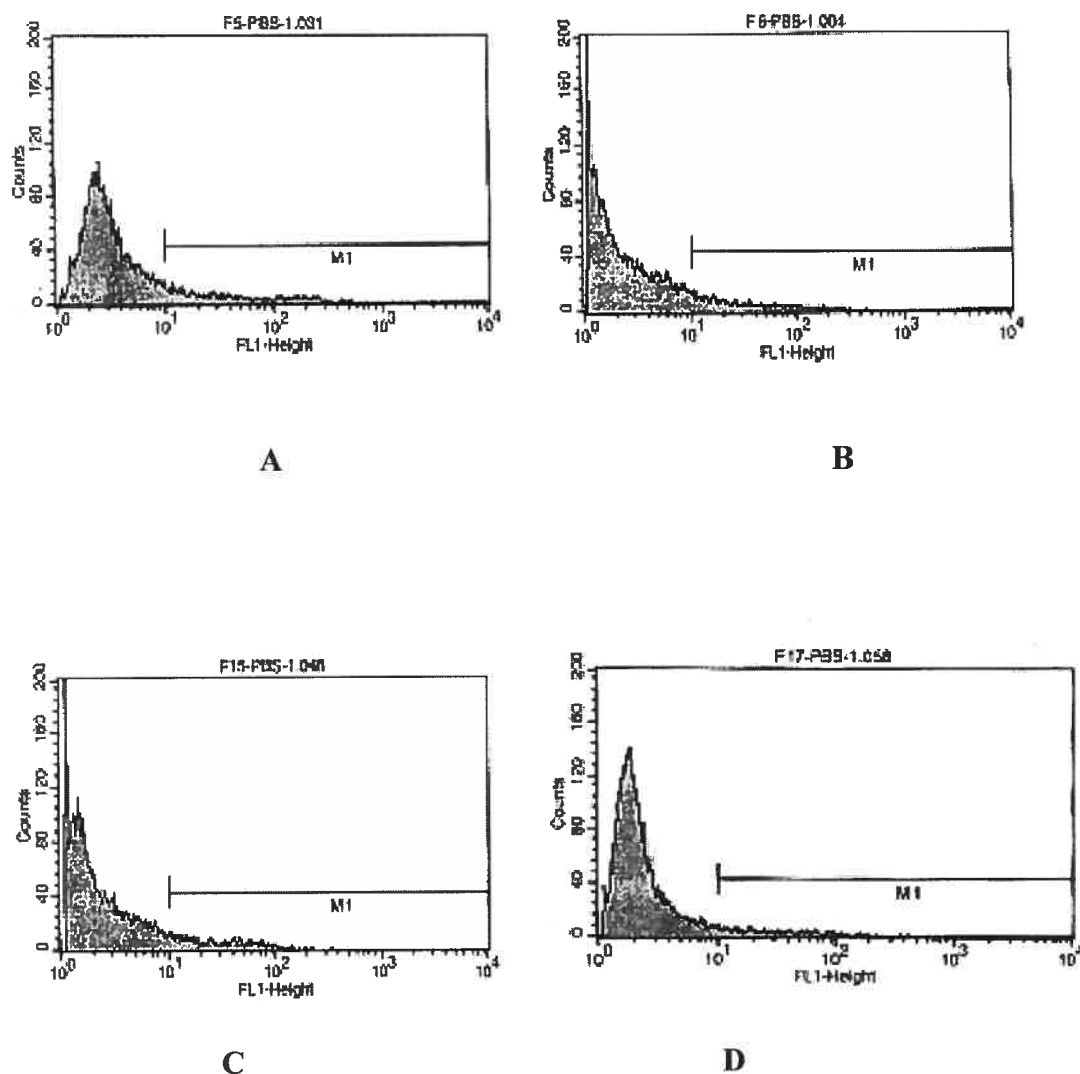
4 : Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (4 vs 3 :  $p = 0,524$ )

Test des paires de Wilcoxon. É.T. : écart-type

Des auteurs ont récemment rapporté que le degré de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes de fumeurs serait plus élevé que celui des non-fumeurs (Potts et coll., 1999; Sun et coll., 1997). Un des mécanismes possiblement impliqués dans cet effet nocif du tabagisme pourrait être une production de SOR par les spermatozoïdes, plus grande chez les fumeurs que chez les non-fumeurs.

Dans notre étude, nous avons comparé la production de SOR par des échantillons de sperme provenant de 9 fumeurs à celle de 2 non-fumeurs et de 18 patients anonymes dont le couple consulte pour infertilité. Chez ces derniers, le statut de tabagisme est indéterminé ; notons qu'à la clinique de fertilité du CHUM, 23 % des hommes fument.

Quatre spécimens de sperme des fumeurs (F05, F15, F17, F06) ont été également analysés par la technique TUNEL (figure 15). Dans les 4 cas, le taux de fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes était normal, inférieur au seuil d'environ 10%.



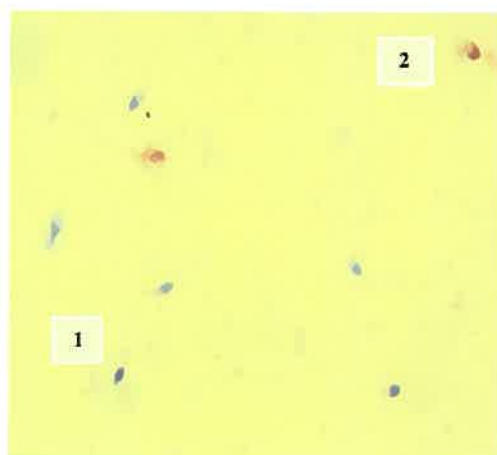
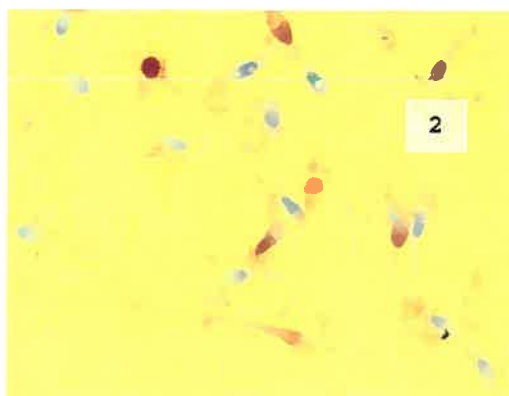
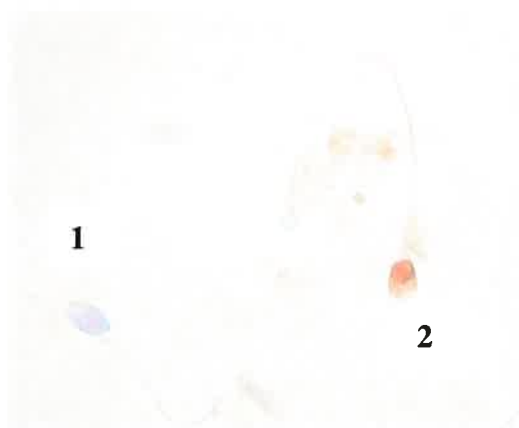
**Figure 15 : Mesure de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes de fumeurs.** L'analyse a été effectuée par la technique TUNEL, et les résultats sont présentés sous la forme d'histogrammes de la fréquence en fonction de l'intensité de fluorescence. Fumeur F05 (A) ; fumeur F06 (B) ; fumeur F15 (C) ; fumeur F17 (D).

### 4.3 Coloration de Sternheimer appliquée aux spermatozoïdes

Dans le but d'estimer le taux de mort cellulaire des spermatozoïdes dans différentes conditions et d'évaluer parallèlement l'intégrité de la chromatine, nous avons mis au point une nouvelle méthode de coloration des spermatozoïdes basée sur le colorant de Sternheimer (figure 16). Ce colorant, combinant la safranine et le violet cristal a été développé par Sternheimer et Malbin (1951) afin d'examiner les sédiments urinaires pour y déceler la présence de cellules vivantes ou mortes, telles des leucocytes et des cellules épithéliales. Des données plus récentes indiquent que ces deux colorants peuvent servir de marqueurs de la chromatine, par exemple dans les cellules végétales (Swain et De, 1990), les cellules hépatiques, les cellules épithéliales et les cellules testiculaires chez les souris (Iatskovskii, 1987). La safranine est également considérée comme un colorant fidèle pour le diagnostic histologique de sections congelées d'épithélioma cutané basocellulaire et d'épithélioma malpighien (Tran et coll., 2000), ainsi que des mastocytes en maturation (Chen et Enerbaux, 1999).

Les essais que nous avons effectués avec le colorant de Sternheimer ont montré des propriétés intéressantes pour l'étude des spermatozoïdes. Le violet cristal diffuse à travers la membrane plasmique du spermatozoïde vivant et se rend jusqu'au noyau où, grâce à sa charge positive, il se lie à l'ADN. Il est en effet connu que le violet cristal interagit avec l'ADN (Rozenkranz et Carr, 1971). La safranine, quant à elle, pénètre seulement dans les spermatozoïdes dont la membrane plasmique est endommagée ; en se liant aux protéines et à l'ADN, elle colore en rouge - brun les structures.

Durant plusieurs minutes après le mélange du sperme avec le colorant, l'observation sous microscope, entre lame et lamelle, montre que le noyau des spermatozoïdes très motiles (classe *a*) prend une teinte bleu azur pâle, alors que l'acrosome et le flagelle apparaissent clairs et dépourvus de coloration, ou avec une teinte légèrement bleutée. Au contraire, les spermatozoïdes non motiles (classe *d*) présentent une coloration brun foncé

**A****B****C**

**Figure 16 : Test de viabilité des spermatozoïdes traités au colorant de Sternheimer.** Spermatozoïdes vivants dont la tête apparaît bleu pâle (1). Spermatozoïdes anormaux et morts (2), dont la tête et le flagelle sont rouges. Grossissement : 400X (A) ; 600X (B) et 1 000X (C). Photos A, B prises avec une caméra *Qimaging* sur microscope *Zeiss Axiophot* et photo C prise avec une caméra *Nikon Coolpix 900* sur microscope *LEICA OMR*.

dans le noyau et une teinte brun rougeâtre dans l'acrosome, le flagelle et le cytoplasme. Pour leur part, les spermatozoïdes peu mobiles (classe *b* et *c*) peuvent prendre des teintes intermédiaires au niveau des différentes structures cellulaires. Ces caractéristiques d'affinité tinctoriale nous ont incités à explorer la possibilité que le colorant de Sternheimer puisse servir à caractériser d'une part la viabilité des spermatozoïdes et d'autre part, l'état de la chromatine dans le noyau, et ce, de façon simultanée. Cette avenue de recherche était d'autant plus intéressante que nous possédions un moyen indirect d'évaluer la stabilité de la chromatine, soit la mesure du pourcentage de fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL. Il nous était également facile de mesurer le pourcentage de spermatozoïdes vivants par la coloration éosine/nigrosine, une méthode reconnue comme valide par tous les auteurs dans ce domaine. Après avoir caractérisé les spermatozoïdes entre lame et lamelle, nous avons pu analyser les spermatozoïdes colorés après étalement et séchage des lames. En se référant aux données obtenues entre lame et lamelle, cette méthode permet d'identifier et de compter les spermatozoïdes présentant les caractéristiques suivantes :

1. *Mobilité de grade a*. Il s'agit des spermatozoïdes les plus susceptibles de se rendre au site de fécondation et de réussir la pénétration de la zone pellucide.
2. *Morphologie normale*. L'observation des spermatozoïdes traités avec le colorant de Sternheimer permet de visualiser de manière fine les structures telles le noyau, l'acrosome, le flagelle et le cytoplasme.

Nous avons comparé les résultats de la coloration Sternheimer à ceux d'une méthode standardisée, la coloration vitale à l'éosine/nigrosine, qui estime la viabilité des spermatozoïdes (figure 17). Selon cette méthode, le pourcentage de spermatozoïdes mobiles est généralement proportionnel à la fraction des spermatozoïdes dits vivants.





1. Vivant, normal vu de *face*



2. Vivant, normal vu de *côté*



3. Vivant, anormal : flagelle double



4. Mort, anormal : noyau allongé, reste cytoplasmique



5. Mort, anormal : brisé au niveau du cou



6. Mort, anormal : noyau allongé, reste cytoplasmique, flagelle absent



7. Mort, anormal : reste cytoplasmique



8. Mort, anormal : brisé au niveau du cou

**Figure 17 : Test de viabilité des spermatozoïdes colorés à l'éosine/nigrosine.** Des spermatozoïdes vivants (1, 2, 3) dont la tête et le flagelle apparaissent blancs; 1 et 2 sont morphologiquement normaux et vus sur deux plans différents, 3 est morphologiquement anormal. Des spermatozoïdes morts (4 à 8) dont le flagelle et/ou la tête sont rouges, ces spermatozoïdes présentent des anomalies morphologiques. Grossissement 1 000X. Photo prise avec une caméra Qimaging sur microscope Zeiss Axiophot.

Nous avons comparé les résultats obtenus avec les deux méthodes de coloration, et portant sur 41 échantillons de sperme (tableau 13) ; l'analyse a été faite par le test de  $t$  pairé de Student (figure 18) et en calculant les paramètres de la droite de régression (figure 19).

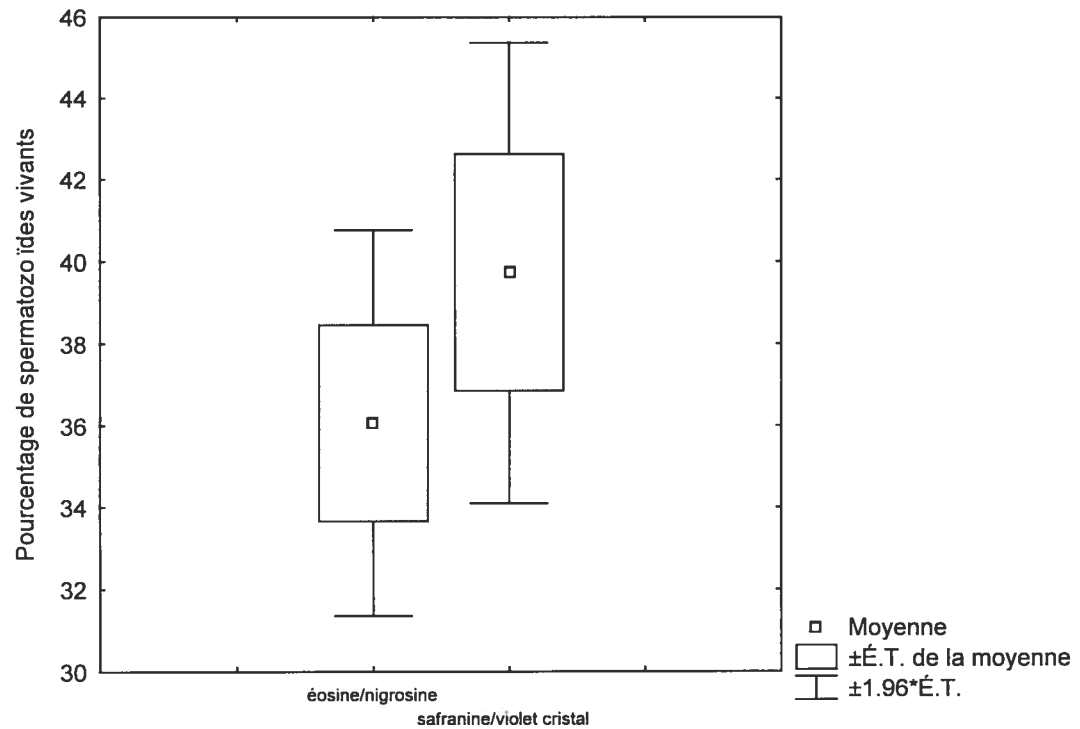
Pour l'ensemble des données présentées au tableau 13, le pourcentage de spermatozoïdes vivants mesuré par la coloration safranine/violet cristal est plus grand que celui à l'éosine/nigrosine ( $p < 0,0001$ , figure 18). Cette différence est également apparente sur les paramètres de la droite de régression calculée pour ces deux pourcentages ( $y = 1,067 x + 1,233$ ; figure 19). Le coefficient de corrélation est élevé, avec  $R = 0,891$ . Quand nous avons analysé les résultats en considérant seulement les valeurs de numération inférieures à  $50 \times 10^6$  spermatozoïdes/mL ( $n = 13$ ), la valeur de  $R$  dans ce cas a atteint 0,973 ( $y = 1,055 x - 3,791$ ) (figure 20A). Une corrélation plus faible ( $R = 0,846$ ) a été obtenue dans le cas des numérations supérieures à  $60 \times 10^6$  spermatozoïdes/mL ( $n = 20$ ) (figure 20A).

Afin de déterminer si la coloration observée au niveau du noyau des spermatozoïdes est reliée à l'intégrité de leur ADN, nous avons comparé le pourcentage de spermatozoïdes vivants selon la coloration avec safranine/violet cristal et le pourcentage de spermatozoïdes avec ADN fragmenté. Pour les 10 échantillons de sperme (tableau 13), nous n'avons pas trouvé de corrélation significative entre ces deux paramètres.

**Tableau 13 : Comparaison des deux méthodes de coloration vitale**

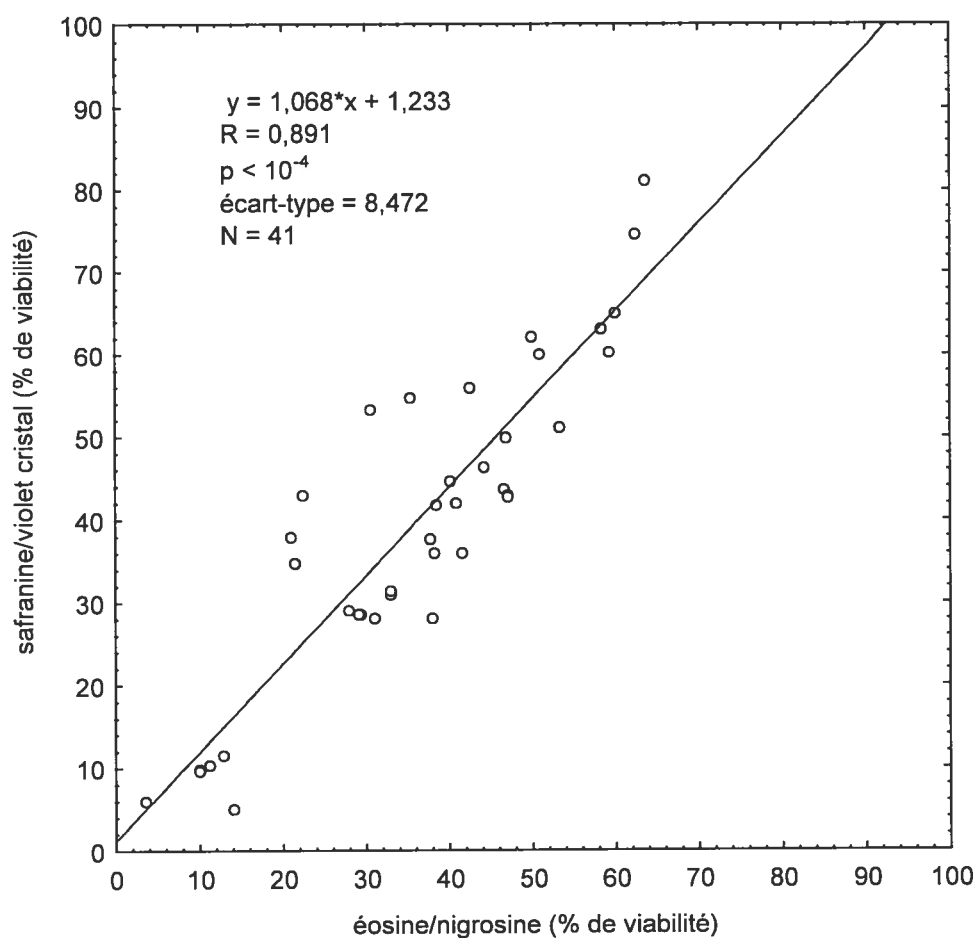
Échantillons de sperme	Volume mL	Numération 10 <sup>6</sup> /ml	Mobilité grade <i>a</i> (%)	Viabilité <sup>1</sup> (% vivants)		% de fragmentation
				Éosine/ nigrosine	Safranine/violet cristal	
1A	3,4	5	0	10,0	9,7	
2A	2,5	12	20	33,0	31,3	
3A	2,5	12	20	33,0	31,0	
4A	3,2	14	20	3,5	6,0	
5A	3,4	16	80	38,0	28,0	
6A	3,0	18	20	40,8	42,0	
7A	4,3	22	95	59,3	60,3	
8A	6,1	23	85	44,3	46,3	
9A	1,1	25	10	14,0	5,1	
10A	3,6	26	5	38,3	36,0	
11A	5,7	27	85	41,6	36,0	
12A	5,1	28	80	31,0	28,1	29
13A	5,1	28	30	31,0	28,0	29
14A	5,9	42	70	46,6	43,6	
15A	3,1	43	80	58,3	63,1	0,5
16A	5,7	50	90	11,2	10,3	
17A	5,1	50	40	28,1	29,0	
18A	3,3	50	60	22,5	43,0	
19A	4,3	50	95	62,5	74,5	
20A	5,1	50	40	28,0	29,0	
21A	4,8	51	90	46,8	50,0	
22A	3,3	55	60	21,5	34,7	
23A	4,7	59	90	63,6	81,0	
24A	2,5	64	50	40,3	44,7	
25A	2,4	65	30	37,6	37,7	
26A	1,3	65	85	35,3	54,7	46
27A	1,3	65	85	35,3	54,7	46
28A	5,1	79	30	29,3	28,6	26
29A	5,1	79	30	29,3	28,6	27
30A	3,1	80	80	47,2	42,8	27
31A	3,1	85	80	47,2	42,8	27
32A	3,5	102	5	10,0	9,83	
33A	3,8	110	80	53,3	51,0	
34A	4,8	113	80	51,0	50,0	
35A	3,0	118	10	30,6	53,3	
36A	1,0	133	80	60,0	65,0	
37A	1,0	178	60	42,5	56,0	
38A	4,3	187	50	38,5	41,8	37
39A	4,6	198	70	50,0	62,0	
40A	0,4	233	30	21,2	37,8	
41A	4,1	292	95	12,9	11,6	

1 : moyenne de 6 déterminations (C.V. = 5%)



**Figure 18 : Mesure de la viabilité des spermatozoïdes colorés selon la technique standardisée éosine/nigrosine versus safranine/violet cristal.**

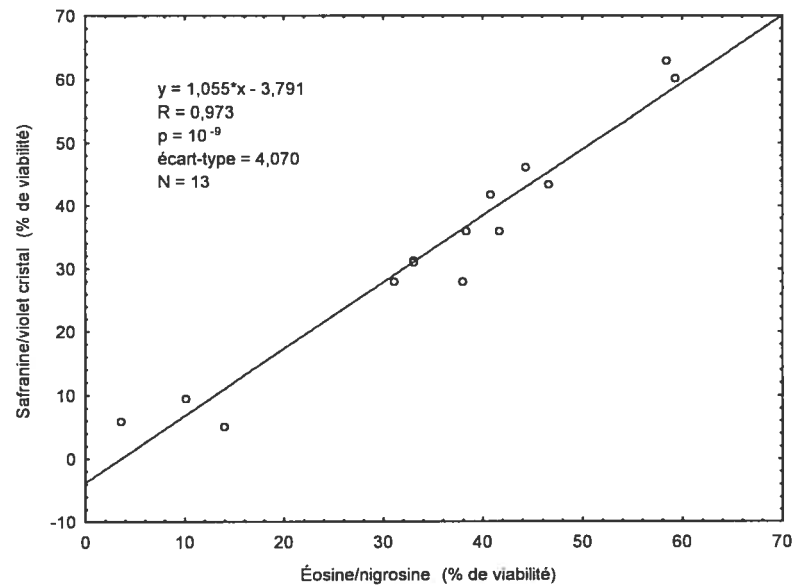
Test de  $t$  pairé :  $N = 41$  ;  $t = 2,628$ ,  $p = 0,012$ . É.T. : écart-type



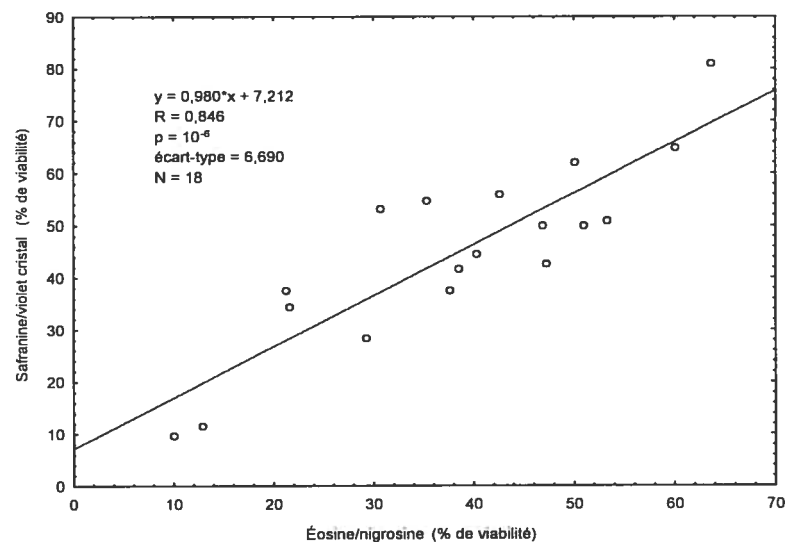
**Figure 19 : Droite de régression entre la viabilité des spermatozoïdes mesurée par les colorations à l'éosine/nigrosine et à la safranine/violet cristal.**

$R = 0,891$  ; écart-type = 8,472 ;  $N = 41$  ;  $p < 0,0001$  (extrêmement significatif).

A



B



**Figure 20 : Droites de régression de la viabilité des spermatozoïdes.** Sperme ayant une numération inférieure à  $50 \times 10^6/\text{mL}$  (A) ou supérieure à  $60 \times 10^6/\text{mL}$  (B) mesurée par les colorations à l'éosine/nigrosine et à la safranine/violet cristal.

#### 4.4 Effet du MKF sur la viabilité des spermatozoïdes

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action du MKF, nous avons examiné son effet sur la viabilité des spermatozoïdes. Dans cette étude, la viabilité a été mesurée selon les deux méthodes : la coloration vitale à l'éosine/nigrosine et la coloration de Sternheimer élaborée dans notre laboratoire.

Dans une autre étude portant sur les spermatozoïdes (G. Laforest, non publié), il a été constaté que la concentration sublétales en MKF se situe dans l'intervalle 0,001% à 0,01% MKF (concentration finale), avec 10 minutes d'exposition au détergent. Dans les présents travaux, nous avons utilisé une concentration létale de MKF à 0,01% et une concentration sublétales de MKF (0,001% ; persistance d'une mobilité faible après 10 minutes de traitement).

En absence de MKF, les valeurs de viabilité des spermatozoïdes mesurées par les deux méthodes étaient du même ordre de grandeur, avec une légère supériorité (attendue) de la technique de Sternheimer. À la concentration sublétales (MKF à 0,001%), la coloration à l'éosine/nigrosine montre une baisse importante de pourcentage de spermatozoïdes blancs (vivants) ( $p < 0,02$ ; test des  $t$  pairé), alors que le pourcentage de spermatozoïdes bleus-pâles mesuré par la technique de Sternheimer n'a que très peu diminué ( $p = 0,0657$  ; test de  $t$  pairé). À la concentration létale (MKF à 0,01%), la coloration à l'éosine/nigrosine donne un pourcentage de cellules vivantes inférieur à 5% (3 cas) ou égal à 0% (3 cas), cette baisse est hautement significative ( $p < 0,001$ , test de  $t$  pairé) (tableau 14 ; figure 21). À la coloration de Sternheimer, la baisse de viabilité est elle aussi significative ( $p = 0,0065$ , test de  $t$  pairé) mais n'atteint pas de valeurs aussi basses qu'avec la coloration à l'éosine/nigrosine.

**Tableau 14 : Comparaison des mesures de la viabilité de spermatozoïdes traités au MKF par coloration avec éosine/nigrosine et avec safranine/violet cristal**

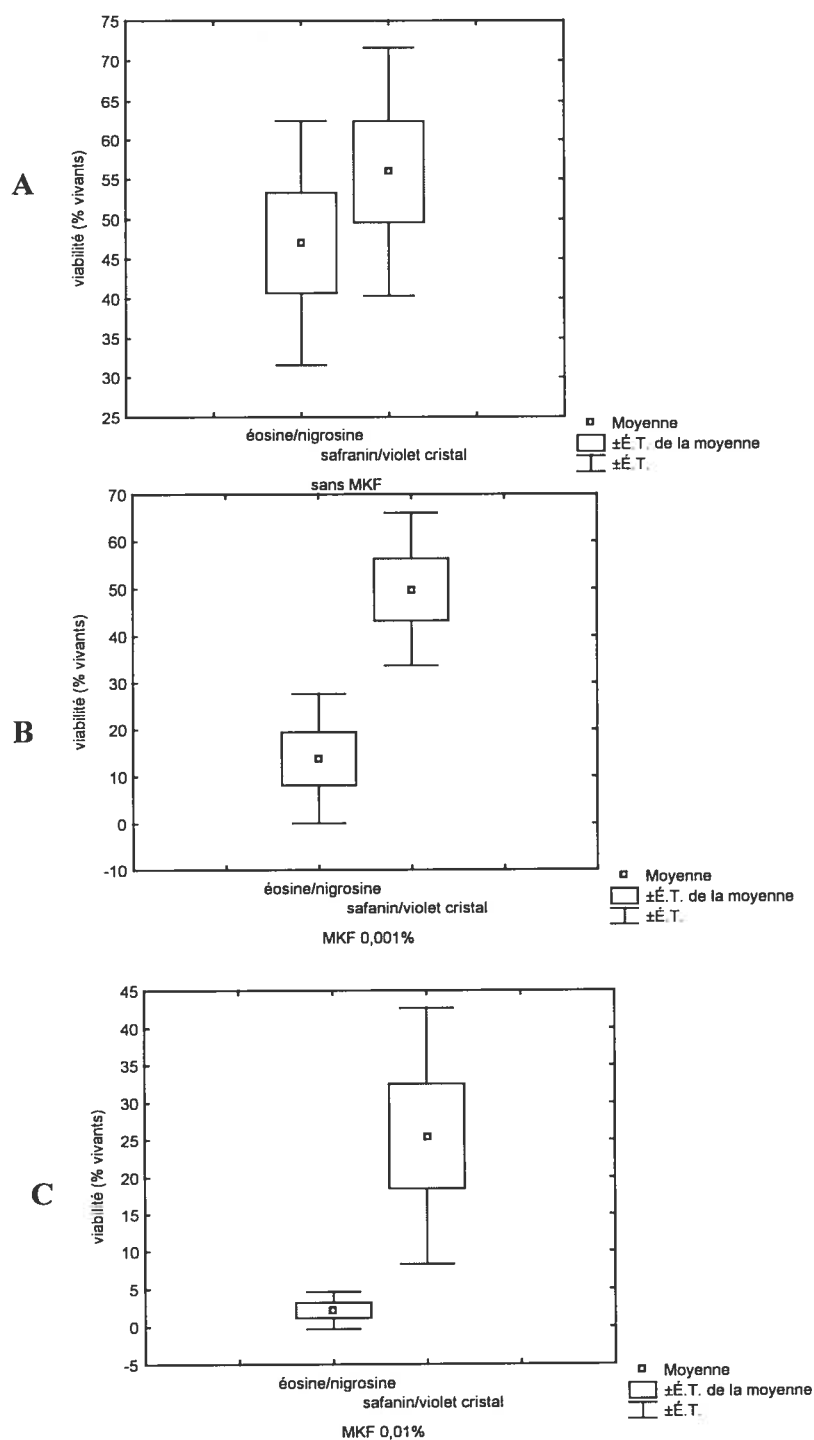
Échantillons de sperme <sup>1</sup>	Spermogramme				Traitement au MKF		
	Volume mL	Nombre 10 <sup>6</sup> /mL	Mobilité % mobile	Morphologie % normal	MKF %	Éosine-nigrosine <sup>2</sup> (% vivant)	Safranine-violet cristal <sup>3</sup> (% bleus-pâles)
1 D	7,2	40	50	60	0	46	58
					0,001	34	52
					0,01	3	34
2 D	3,2	78	40	40	0	48	62
					0,001	28	59
					0,01	5	21
3 D	2,4	54	35	40	0	37	41
					0,001	11	37
					0,01	5	15
4 D	2,7	27	5	30	0	25	35
					0,001	5	32
					0,01	0	25
5 D	3,2	81	70	70	0	56	62
					0,001	2	43
					0,01	0	4
6 D	4,1	60	80	75	0	70	78
					0,001	3	76
					0,01	0	54

1 : Sperme des patients dont le couple consulte pour infertilité

2 : Moyenne de 3 déterminations (C.V. = 8%).

3 : Ibid.





**Figure 21 : Comparaison des deux méthodes de coloration vitales des spermatozoïdes traités au MKF. A :  $p = 0,002$  ; B :  $p = 0,006$  ; C :  $p = 0,008$ . Test de  $t$  pairé. É.T. :écart-type**

Ces observations peuvent s'expliquer sur la base du mécanisme d'action connue du MKF. Ce surfactant cationique interagit avec la bicouche lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes ; il les rend perméables et immobiles suite à un débalancement osmotique. C'est pourquoi il cause une mort cellulaire rapide, observable avec la coloration à l'éosine/nigrosine.

Par contre, la coloration de Sternheimer estime plus spécialement l'intégrité de la chromatine : le violet cristal diffuse à travers la membrane plasmique du spermatozoïde vivant et se lie à l'ADN pour donner une teinte légèrement bleutée au noyau, et la safranine traverse seulement la membrane cytoplasmique endommagée. Le maintien d'une teinte bleutée indique que le MKF en concentration sub létale n'endommagerait pas l'ADN des spermatozoïdes malgré que les spermatozoïdes soient morts.

## 5. DISCUSSION

Pour établir les liens entre le stress oxydatif et les anomalies du sperme humain, la recherche en infertilité masculine s'intéresse aux paramètres suivants : 1) la détection directe de la formation de SOR par les spermatozoïdes et les leucocytes du sperme; 2) l'identification des agents nocifs susceptibles d'induire une génération de SOR par les spermatozoïdes; 3) l'impact de la peroxydation des lipides membranaires sur les fonctions du spermatozoïde et, 4) l'évaluation des dommages à l'ADN des spermatozoïdes causés par les SOR (Aitken, 1999; Sakkas et coll., 1999a et b; Griveau, LeLannou, 1997). Dans ce contexte, il est important de souligner que la technique ICSI, une méthode qui a révolutionné le traitement de l'infertilité masculine, ne réussit que si les spermatozoïdes sont de bonne qualité, particulièrement quant à l'intégrité de leur ADN.

Par leur mode d'action, les SOR peuvent non seulement détruire directement la membrane plasmique des spermatozoïdes en entraînant la peroxydation lipidique, mais aussi agir comme médiateurs chimiques et causer des dommages à l'ADN. Plusieurs travaux ont permis d'établir une relation entre un taux élevé de génération de SOR dans le sperme et la perte de fonctions des spermatozoïdes dans diverses formes d'infertilité masculine.

Dans le présent travail, nous avons mesuré, par la chimiluminescence, la production basale et induite de SOR par les cellules du sperme de donneurs et de patients consultant pour infertilité. Nous avons également étudié l'effet des agents nocifs sur la viabilité des spermatozoïdes et leur production de SOR. Finalement, nous avons mis au point une nouvelle méthode de coloration des spermatozoïdes et l'avons appliquée à l'étude du lien hypothétique entre l'effet d'un nouveau spermicide (MKF) sur la fragmentation de l'ADN et la génération de SOR par les spermatozoïdes.

### 5.1 Production de SOR par les cellules du sperme

Comme nous voulions que nos mesures incluent la production de SOR de toutes sources possibles, nous avons travaillé sur la fraction entière des cellules du sperme, obtenue par centrifugation et lavage, sans séparer ou éliminer (e.g. PMN) certaines cellules. Ce point est important car un agent nocif, par exemple le MKF, pourrait engendrer des effets sur les spermatozoïdes en agissant sur la production de SOR par les polymorphonucléaires.

Dès les premiers essais, nous avons observé que la production de SOR par les spermatozoïdes normaux non « activés » est minime, parfois difficile à détecter par chimiluminescence en présence de luminol. Ainsi, quand le sperme utilisé était d'excellente qualité (hauts pourcentages de mobilité et de morphologie normale), l'émission de chimiluminescence était très faible. Par contre, l'analyse cytologique des échantillons de sperme a permis de confirmer que les sources majeures de production de SOR sont : les leucocytes polymorphonucléaires, les spermatozoïdes avec reste cytoplasmique, les cellules germinales précurseurs (surtout des spermatocytes et des spermatides) et les spermatozoïdes morphologiquement anormaux. Nous avons noté une concordance parfaite entre un taux élevé de chimiluminescence basale et la présence de cellules autres que des spermatozoïdes normaux.

Kobayshi et coll. (2001) ont rapporté une corrélation significative entre le nombre des spermatozoïdes analysés et la chimiluminescence. Dans le présent travail, nous n'avons pas observé une telle corrélation. À notre avis, cette différence s'explique par le fait que Kobayashi et coll. ont établi cette corrélation en utilisant des quantités croissantes de spermatozoïdes d'un même sujet et dans le même essai, alors que nos données portent sur des nombres de spermatozoïdes de sujets différents. De plus, notre étude inclut des échantillons contenant aussi des cellules autres que des spermatozoïdes normaux, d'où une source de variation inter-individus très importante.

Afin de nous assurer de notre capacité à bien mesurer les SOR, nous avons mesuré la chimiluminescence induite par le PMA et le NADPH.

Le PMA stimule la génération de SOR par les spermatozoïdes et les leucocytes par un mécanisme impliquant l'activation de protéine kinase C. Plusieurs études ont associé la chimiluminescence des spermatozoïdes induite par le PMA à la pauvre qualité des spermatozoïdes, à leur morphologie anormale (Gil-Guzman et coll., 2001), à la présence des cellules immatures (Gil-Guzman et coll., 2001; Ollero et coll., 2001; Gomez et coll., 1996) et à la coexistence de grandes quantités des leucocytes (Saleh et coll., 2002).

Dans notre étude, nous avons mesuré la chimiluminescence induite par le PMA sur certains échantillons de sperme contenant un nombre élevé de leucocytes, de restes cytoplasmiques, de cellules immatures de lignée spermatique et/ou de spermatozoïdes morphologiquement anormaux (selon l'analyse cytologique). Dans les cas de leucocytospermie, nous avons observé une très grande réponse, en valeurs absolues, de la chimiluminescence induite par le PMA, ceci correspond cependant à seulement 18% d'augmentation par rapport à la chimiluminescence basale. En présence de cellules immatures ou des spermatozoïdes anormaux, la chimiluminescence induite par le PMA est 5 à 15 fois plus grande que la chimiluminescence basale. Dans les cas de normozoospermie, l'augmentation de chimiluminescence induite par le PMA a été seulement 3 fois supérieure à la valeur de chimiluminescence basale. Ainsi, une augmentation importante de chimiluminescence induite par le PMA peut indiquer des spermatozoïdes de piètre qualité et signaler la présence des spermatozoïdes anormaux ou immatures. Nos observations confirment les résultats obtenus par Saleh et coll. (2002).

Plusieurs études ont constaté que les spermatozoïdes humains peuvent utiliser le NADPH comme substrat pour la génération de SOR (Aitken, 1997; de Lamirande et Gagnon, 1999). Toutefois, seuls les spermatozoïdes vivants peuvent manifester cette activité lorsque le NADPH est ajouté au milieu. Cependant, à cause de sa masse

moléculaire élevée, ce coenzyme a besoin de conditions augmentant la perméabilité membranaire pour pénétrer dans la cellule.

Lors d'une production de quantités importantes de SOR, il semble plus probable que le NADPH pénètre la membrane plasmique des spermatozoïdes et interagisse avec une (ou plusieurs) oxydase intracellulaire localisée dans le cytoplasme ou à la surface interne de la membrane plasmique.

Nous avons examiné l'effet du NADPH sur la production de SOR par les spermatozoïdes intacts suspendus dans le tampon de PBS : aucun accroissement de la chimiluminescence n'a été enregistré. Par contre, des spermatozoïdes traités au Triton X100 ou au MKF en concentration faible (0,001%) et suspendus dans un tampon à forte concentration de sucrose répondent au NADPH par une augmentation de chimiluminescence. Notons que le MKF à une concentration plus grande que sublétales (0,01%) cause la mort des spermatozoïdes alors qu'à faible concentration, il produit un effet similaire à celui du Triton X100 : il augmente la perméabilité de la membrane plasmique, permet au NADPH de pénétrer à l'intérieur du spermatozoïde et de servir de substrat à l'oxydase dépendante du NADPH, responsable de la production de SOR.

Nos résultats appuient donc l'hypothèse d'une oxydase (non isolée et non caractérisée à ce jour) intra -cytoplasmique ou localisée à la surface interne de la membrane plasmique.

Les données que nous avons obtenues sur la congélation/décongélation des spermatozoïdes sont aussi en accord avec cette hypothèse. Ainsi, on sait que la congélation/décongélation des spermatozoïdes augmente la perméabilité de leur membrane plasmique, rendant donc plus facile la pénétration du NADPH. À cet égard, nous avons observé une augmentation statistiquement significative de la chimiluminescence des spermatozoïdes congelés/décongelés suite à l'addition de NADPH.

## 5.2 Effet du MKF sur la production de SOR par les cellules du sperme

Le MKF est un nouvel agent spermicide actuellement à l'étude dans notre laboratoire ; il ressemble au chlorure de benzalkonium, un spermicide déjà utilisé en contraception locale.

Comme les autres détergents qui agissent sur la bicouche lipidique de la membrane plasmique des spermatozoïdes, le MKF entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire et un déséquilibre osmotique responsables de la perte de mobilité et ultimement de la mort cellulaire. Il a été démontré que le chlorure de benzalkonium, utilisé dans des préparations ophtalmiques peut causer la production de SOR par les cellules conjonctivales humaines en culture et induire une fragmentation de l'ADN (Debbasch et coll., 1999). Nous avons émis l'hypothèse que le MKF pourrait agir de façon similaire sur les spermatozoïdes. Étant donné que la contraception par spermicide échoue dans 6 à 21% des cas (Journal SOGC, 1998), un spermatozoïde exposé à une concentration sublétalement de spermicide et ayant son ADN endommagé pourrait réussir à féconder un ovocyte. En conséquence, des défauts génétiques d'origine paternelle seraient transmis au zygote, et pourraient conduire à des anomalies du développement embryonnaire et fœtal, ainsi qu'à une incidence plus élevée de cancer chez les enfants. Rappelons qu'un faible taux de fragmentation de l'ADN dans les spermatozoïdes est un phénomène fréquent causé par une protamination incomplète, une apoptose partielle ou un stress oxydatif léger. Dans ces cas, l'ovocyte fécondé par un tel spermatozoïde est capable de réparer les dommages légers de l'ADN ; par contre, des dommages plus étendus à l'ADN peuvent dépasser la capacité de l'ovocyte à effectuer les réparations (Sakkas et coll., 1999).

Dans le but de vérifier cette hypothèse nous avons mesuré la production de SOR par des spermatozoïdes traités au MKF en concentration létale. Dans tous les cas, nous n'avons pas observé d'augmentation de la chimiluminescence. De plus, nous avons observé une diminution de la chimiluminescence dans les cas de sperme contenant des cellules autres que les spermatozoïdes normaux, une source importante de génération de SOR. Il est

probable que la diminution de la chimiluminescence a été causée par la mort cellulaire induite par le MKF. Le MKF pourrait aussi agir comme inhibiteur de l'activité d'enzymes impliqués dans les voies métaboliques nécessaires à la génération de SOR.

Debbasch et coll. (1999) ont rapporté que les cellules traitées par de fortes concentrations d'ammoniums quaternaires (0,005 à 0,01%) meurent par nécrose tandis que les concentrations moins importantes induisent l'apoptose associée à une production de SOR. Puisque nous nous sommes intéressés aux concentrations sublétales qui correspondent à 0,01%, nos premiers travaux ont porté sur l'effet du MKF à cette concentration. Nous avons également étudié l'action du MKF en concentration faible (0,001%) sur la viabilité des spermatozoïdes et sur leur production de SOR mesurée par chimiluminescence. À cette faible concentration, le détergent n'a pas induit la production de radicaux libres par ces cellules. Également dans les cas où le sperme contenait un grand nombre des cellules de la lignée spermatique (donc une chimiluminescence élevée), le traitement des cellules au MKF pendant 15 minutes a provoqué une diminution de chimiluminescence.

En résumé, notre étude montre que le MKF, tant à une concentration de 0,001% que de 0,01% ne provoque pas la génération de SOR par les spermatozoïdes. Nous en déduisons que leur ADN ne peut pas être endommagé de cette façon.

Des résultats récents obtenus dans notre laboratoire (G. Laforest, non publiés) indiquent que le MKF agirait en « ouvrant » la chromatine du spermatozoïde, permettant un accès plus facile à l'enzyme utilisée pour le marquage des extrémités 3' de l'ADN, mais ne causerait pas de brisures nouvelles de l'ADN.



### 5.3 Effet de la cryopreservation sur la production de SOR par les cellules du sperme

La cryopréservation du sperme joue un rôle important dans l'insémination thérapeutique avec sperme de donneur et pour la conservation du sperme de patients en attente de radio ou chimiothérapie ou vasectomie. Le succès de la cryopréservation dépend, en grande partie, de la sensibilité spécifique des cellules du sperme aux températures basses. Deux étapes majeures, la réfrigération et la décongélation, affectent la structure et la fonction des spermatozoïdes. Plusieurs cycles de congélation/décongélation causent des dommages à la membrane plasmique des spermatozoïdes, réduisent leur mobilité et leur capacité à féconder, induisent une capacitation prématurée et la décondensation nucléaire (Chatterjee et Gagnon, 2001). Bien que l'utilisation des cryoprotecteurs (comme le glycérol, le jaune d'oeuf et le lait) diminue l'effet nocif de la congélation/décongélation sur les spermatozoïdes, des modifications significatives au niveau de l'acrosome, des mitochondries et de la membrane plasmique ont été observées (Chatterjee et coll., 2001).

La mesure du degré de la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes constitue un paramètre plus stable et plus fidèle de la fertilité masculine que les données du spermogramme. Plusieurs méthodes comme les techniques SCSA, TUNEL et COMET permettent de mesurer ce paramètre. Toutefois, on utilise souvent du sperme congelé ; il est donc important de s'assurer que la cryopréservation elle-même ne cause pas de fragmentation de l'ADN.

La grande variabilité des effets de la cryopréservation dépend surtout des conditions utilisées, particulièrement du type de cryoprotecteurs, de la vitesse de réfrigération et de congélation, ainsi que de la température finale de conservation. Des protocoles standardisés ont été développés permettant une récupération adéquate de la mobilité et du pouvoir fécondant des spermatozoïdes. Cependant, la qualité initiale du sperme demeure un facteur limitant, très important et difficile à améliorer. En effet, certains spermatozoïdes résistent très mal à la congélation, voire perdent tout pouvoir fécondant.

Plusieurs études ont porté sur les effets de la congélation/décongélation sur la qualité du sperme (Rodriguez-Martinez et Ekwall, 1998 ; Anzar et coll. (2002) ont appliqué la technique TUNEL au sperme bovin frais et congelé ; ils ont rapporté que la cryopréservation cause l'apoptose et la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes, ainsi qu'une surcondensation de leur ADN ; tous ces changements contribuent à la baisse de fertilité du sperme après congélation.

En utilisant une technique très sensible, Chatterjee et coll. (2001) ont observé une production de radicaux libres durant la phase de réfrigération lente (de 22°C à 4°C, en présence d'un cryoprotecteur) des spermatozoïdes bovins. Une formation d'oxyde nitrique a aussi été détectée pendant la décongélation.

Les résultats d'études sur l'influence possible de la cryopréservation sur la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes sont contradictoires. Par exemple, Steele et coll. (2000), utilisant la technique COMET (analyse unicellulaire sur gel d'électrophorèse) n'ont pas trouvé de différence significative entre le degré de dommage à l'ADN des spermatozoïdes testiculaires humains frais et congelé/décongelé (en présence d'un cryoprotecteur). Cependant, ils ont noté que l'ADN des spermatozoïdes éjaculés était plus endommagé que celui des spermatozoïdes testiculaires (Wood et coll., 2002). En utilisant le même test COMET, Donnelly et coll. (2001) ont observé que la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes congelés en présence des cryoprotecteurs est significativement plus grand chez les patients infertiles que chez les donneurs. Par le test de COMET, Duty et coll. (2001) ont trouvé que l'ADN des spermatozoïdes humains congelés avec cryoprotecteur est plus endommagé que celui des spermatozoïdes plongés directement dans l'azote liquide.

Devant ces incertitudes, nous avons vérifié si la congélation/décongélation des spermatozoïdes est susceptible de générer une formation de SOR, lesquels pourraient être une cause de fragmentation de l'ADN. Cette donnée est en effet importante dans l'interprétation des résultats des techniques de mesure de la fragmentation de l'ADN. Le sperme éjaculé a été rapidement congelé dans l'azote liquide sans cryopréservateur, puis

décongelé dans un incubateur à 37°C dans le but d'augmenter les chances d'observer une production de radicaux libres.

Après congélation/décongélation, aucun des 29 échantillons de sperme n'émettait de chimiluminescence basale en présence de luminol. Par contre, les échantillons frais émettant une forte chimiluminescence ont complètement perdu la capacité de générer des SOR, probablement à cause de la nécrose des cellules du sperme responsables de la production du SOR. Rappelons que l'addition de NADPH à la suspension de cellules du sperme congelé/décongelé entraîne une faible réponse de chimiluminescence ; il semble donc que certains des spermatozoïdes capables de produire des SOR restent vivants dans les conditions d'expérimentation. Comme la cryopréservation du sperme ne provoque pas de génération détectable de SOR par les spermatozoïdes, on ne peut invoquer la responsabilité des radicaux libres dans la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes rapidement congelés dans l'azote liquide et décongelés à 37°C. Il est probable que les cellules du sperme meurent avant que les voies de production de radicaux libres n'aient le temps d'être activées.

#### **5.4 Effet du tabagisme sur la production de SOR par les cellules du sperme.**

L'effet nocif du tabagisme sur la santé est indiscutable. Puisque la fumée de cigarette contient de nombreuses substances oxydantes, mutagènes et cancérigènes, on craint également ses effets indésirables sur la fertilité masculine. Malgré que les résultats soient virement controversés, la moitié des études ont rapporté que le tabagisme était associé non seulement à une réduction générale de la qualité du sperme (numération, mobilité et morphologie des spermatozoïdes) (Sofikitis et coll., 1995 ; Vine et coll., 1996) et à des anomalies du caryotype (Shi et coll., 2001), mais aussi à un taux bas d'antioxydants dans le sperme et à une augmentation du stress oxydatif et des dommages à l'ADN (Fraga et coll., 1996, Shen et coll., 1997).

Dans cette étude pilote nous avons voulu vérifier l'effet du tabagisme sur le taux de production de SOR dans le sperme. Neuf fumeurs, dont six sont de fertilité prouvée ont été recrutés. Les résultats ont été comparés à ceux d'un groupe d'hommes dont le couple consulte pour infertilité.

Dans quatre cas, la mesure concomitante de la fragmentation de l'ADN par la technique TUNEL n'a pas non plus révélé de dommages à l'ADN des spermatozoïdes chez les sujets fumeurs. Donc, nos résultats préliminaires contredisent les études qui ont rapporté une augmentation de la fragmentation de l'ADN dans des spermatozoïdes de fumeurs comparativement aux non-fumeurs (Potts et coll., 1999 ; Sun et coll., 1997). Par contre, nos résultats concordent avec ceux de Sergerie et coll., 2000 qui n'ont pas observé d'association entre la tabagisme et la fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes des donneurs fertiles, mesurée par la technique TUNEL.

L'échantillonnage trop petit et le statut indéterminé de tabagisme des fumeurs limitent la conclusion. On peut cependant remarquer que nous n'avons pas observé de fragmentation augmentée de l'ADN chez 4 échantillons de sperme de fumeurs. De plus, il ne semble pas y avoir de différence dans le niveau de chimiluminescence des spermatozoïdes de fumeurs (9) et de non fumeurs (2). Notre étude préliminaire mérite donc d'être poursuivie afin d'augmenter le nombre de sujets et de constituer un groupe témoin plus approprié.

### **5.5 Mise au point et validation d'une nouvelle méthode de coloration des spermatozoïdes**

Nous avons, pour la première fois, utilisé le colorant de Sternheimer dans le but d'estimer simultanément la viabilité des spermatozoïdes et l'intégrité de leur chromatine. Effectué en parallèle avec la méthode standardisée utilisant l'éosine/nigrosine, nous avons observé une corrélation étroite entre les résultats des méthodes, ce qui démontre que la coloration de Sternheimer est fiable et exacte. L'analyse comparative des deux méthodes a

révélé une corrélation plus forte lorsque la numération des spermatozoïdes est inférieure à  $50 \times 10^6/\text{mL}$ . Ceci suggère que les deux méthodes évaluent des propriétés cellulaires différentes.

Sur la base des propriétés chimiques et biochimiques de la safranine et du violet cristal composant le colorant de Sternheimer, nous proposons que le mécanisme de coloration repose sur la capacité différente de la safranine et du violet cristal à diffuser à travers la membrane plasmique et sur leur spécificité de liaison aux protéines ou à l'ADN des spermatozoïdes. Le violet cristal, un dérivé de la rosaniline, diffuse plus facilement à travers la membrane plasmique du spermatozoïde vivant et se rend jusqu'au noyau où il se lie à l'ADN, grâce à sa charge positive (Hussain et Khan, 1971). La safranine, un dérivé de l'azine, pourrait traverser une membrane plasmique déjà perméabilisée à cause d'un débalancement osmotique dans les cellules mortes ; elle colore les structures en se liant aux protéines et aux nucléoprotéines.

Il a été rapporté que la safranine pénètre la membrane cellulaire à cause du changement de potentiel électrochimique membranaire et à cause de la dépolarisation de la membrane induite par le calcium (Hassinen, 1986). De plus, la safranine pourrait agir comme une sonde estimant le potentiel électrique de la membrane plasmique des mitochondries. Rappelons que la perte du potentiel transmembranaire des mitochondries joue un rôle clé dans l'apoptose (Green et Reed, 1998 ; Kauppinen et Hassinen, 1984). D'autre part, le haut potentiel électrochimique de la membrane mitochondriale permet la production de SOR via système de transfert des électrons dans les mitochondries, en activant les canaux potassiques et certaines protéines mitochondriales (Pastore et coll., 2000 ; Pastore et coll., 2002).

La combinaison de la safranine et du bleu d'alcan a été utilisée pour différencier l'euchromatine de l'hétérochromatine, un reflet de l'activité fonctionnelle du noyau. Grâce à cette coloration, Iatskovskii (1992) a observé chez la souris que la chromatine des cellules

testiculaires post-mitotiques, des spermatides tardives, et de certaines spermatogonies étaient rouges comparativement aux autres cellules de la lignée spermatique qui étaient bleues ou bleues/rouges. Cette coloration spécifique à la chromatine est basée sur la capacité de la safranine et du bleu d'alcan à diffuser de façons différentielles à travers les structures des nucléoprotéines de densités différentes.

En résumé, puisque la méthode standardisée à l'éosine/nigrosine mesure seulement le pourcentage des spermatozoïdes dont la perméabilité de la membrane plasmique est compromise, la nouvelle méthode présente donne un certain avantage, soit celui de différencier les spermatozoïdes immobiles mais vivants de ceux qui sont morts. La technique donne également la possibilité de mieux qualifier la mobilité des spermatozoïdes. Nous proposons que la présence de plusieurs cellules vivantes mais immobiles indique par exemple des défauts structuraux dans le flagelle.

L'utilité de la nouvelle méthode est illustrée par l'étude de l'effet du MKF sur la viabilité des spermatozoïdes. Les deux méthodes, alors qu'elles estiment la viabilité des spermatozoïdes traités au MKF, donnent des résultats différents. Des mécanismes différents de coloration des structures du spermatozoïde expliquent ces différences.

Le MKF, un surfactant cationique fort, perturbe la bicouche lipidique des spermatozoïdes et les rend perméables et immobiles suite à un débalancement osmotique. Puisque la coloration vitale à l'éosine/nigrosine estime la viabilité des spermatozoïdes selon leur intégrité membranaire, elle démontre la mortalité rapide causée par le MKF. Donc, la coloration standardisée pourrait évaluer seulement l'action du MKF sur la membrane plasmique des spermatozoïdes. Par contre, la coloration de Sternheimer estime plus spécialement l'intégrité de la chromatine. Puisque les spermatozoïdes colorés par la méthode de Sternheimer apparaissent vivants en présence de MKF en concentration sublétales, nous concluons que cette concentration de MKF, ne détruit pas la chromatine des spermatozoïdes. Ces observations concordent avec les données basées sur la mesure de la

chimiluminescence des spermatozoïdes traités au MKF et le marquage par la technique TUNEL.

## 6. CONCLUSION

L'intérêt grandissant pour la recherche sur les radicaux libres et le stress oxydatif, ainsi que leurs effets nocifs sur la fertilité masculine a conduit au développement de plusieurs techniques pour mesurer le taux de production de SOR par les spermatozoïdes humains.

Dans la présente étude, nous avons appliqué une méthode de chimiluminescence pour mesurer la capacité des cellules du sperme à générer des SOR, tant à l'état basal que stimulé par le PMA et le NADPH. À l'aide d'analyses cytologiques, nous avons observé une corrélation entre le taux de chimiluminescence basale et la présence de cellules du sperme différentes des spermatozoïdes normaux. Nous avons confirmé que la chimiluminescence induite par le PMA permet de révéler l'activité de production de SOR par les cellules germinales précurseurs de la lignée spermatique et les spermatozoïdes morphologiquement anormaux.

En mesurant la chimiluminescence des spermatozoïdes en présence de NADPH, nous avons confirmé que l'oxydase NADPH -dépendante, responsable de la génération des SOR par les spermatozoïdes, se localise soit dans le cytoplasme ou à la partie interne de la membrane plasmique.

La possibilité d'un effet nocif du MKF, d'un agent spermicide a été examinée. Bien que le MKF induise la nécrose des spermatozoïdes et aussi de la plupart des cellules du sperme, il ne provoque pas la génération des SOR ; par conséquent, il ne peut être responsable d'une fragmentation de l'ADN des spermatozoïdes. Donc, en cas d'échec de la concentration locale, ce nouveau spermicide serait sécuritaire pour le matériel génétique paternel transmis à l'ovocyte lors de la fécondation.



Nous n'avons pas observé de production de SOR par les spermatozoïdes congelés dans l'azote liquide sans cryoprotecteur, probablement, parce que ces conditions causent une mort rapide des cellules du sperme. Puisque l'ADN des spermatozoïdes ne peut, de ce fait, être fragmenté par l'action des SOR, ce protocole de cryopréservation serait adéquat pour la conservation des spermatozoïdes en vue du marquage TUNEL.

La possibilité d'un effet nocif du tabagisme sur la génération de SOR par les spermatozoïdes, avec ses répercussions sur la fragmentation de leur ADN et la fertilité masculine demeure un sujet discutable, surtout à cause du manque de données théoriques pour expliquer les observations et à cause de la difficulté de reproduire les résultats d'un laboratoire à l'autre. Bien que les résultats de l'étude présente montre que le dommage de l'ADN dans des spermatozoïdes chez fumeurs ne semble pas causer par des SOR, l'influence de la fumée de cigarettes sur des fonctions des spermatozoïdes reste encore à vérifier.

Finalement, nous avons élaboré une nouvelle méthode pour évaluer la viabilité des spermatozoïdes : la coloration de Sternheimer. Par rapport à la coloration vitale avec l'éosine/nigrosine, la coloration de Sternheimer permet d'évaluer simultanément la viabilité des spermatozoïdes et l'intégrité de leur chromatine. La nouvelle méthode a été appliquée avec succès pour mesurer l'effet du MKF sur la viabilité des spermatozoïdes. Le MKF provoque la mort des spermatozoïdes mais ne cause pas le dommage apparent à leur matériel génétique.

## 7. BIBLIOGRAPHIE

- Agarwal, A., Shekariz, M., Sidhu, R.K., Thomas, A.J. (1996). Value of clinical diagnosis in predicting the quality of cryopreserved sperm from cancer patients. *J. Urol.*, **155**, 934-938.
- Ahmadi, A., Ng, S.-C. (1999). Fertilizing ability of DNA-Damaged spermatozoa, *J. Exp. Zool.*, **284**, 696-704.
- Aitken, R.J. (1994). A free radical theory of male infertility. *Reprod. Fertil. Dev.*, **6**, 19-24.
- Aitken, R.J. (1995). Mechanism and prevention of lipid peroxidation. *Montrouge, John Libby Eurotext*, pp. 339-353.
- Aitken, R.J. (1999). The human spermatozoon- a cell in crisis? *J. Reprod. Fertil.*, **115**(1), 1-7.
- Aitken, R.J. (2003). Reactive oxygen species generation by human spermatozoa - reply. *Int. J. Androl.*, **26**(2), 127.
- Aitken, R.J., Baker, M.A. (2002). Reactive oxygen species generation by human spermatozoa: a continuing enigma. *Int. J. Androl.*, **25**(4), 191-4.
- Aitken R.J., Buckingham D, Carreras A, Irvine D.S. (1996a). Superoxide dismutase in human sperm suspensions: relationship with cellular composition, oxidative stress, and sperm function. *Free Radic. Biol., Med.*, **21**(4), 495-504.
- Aitken R.J., Buckingham D., Harkiss D. (1993). Use of a xanthine oxidase free radical generating system to investigate the cytotoxic effects of reactive oxygen species on human spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, **97**, 451-462.
- Aitken, R.J., Buckingham, D., West, K.M. (1992). Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J. Cell Physiol*, **151**, 466-477.
- Aitken, R.J., Clarkson J.S. (1987). Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, **81**, 459-469.
- Aitken, R.J., Clarkson J.S., Fisher H. (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm. *Biol. Reprod.*, **40**, 183-197.
- Aitken, R.J., Fisher H. (1994). Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bio Essays*, **16**, 259-267.

- Aitken R.J., Fisher H.M., Fulton N., Gomez E., Knox W., Lewis B., Irvine S. (1997). Reactive oxygen species generation by human spermatozoa is induced by exogenous NADPH and inhibited by the flavoprotein inhibitors diphenylene iodonium and quinacrine, *Mol. Reprod. Dev.*, **47**, 468-482.
- Aitken, R.J., Gordon, E., Harkiss, D., Twigg, J.P., Milne, P., Jennings, Z., Irvine, D.S. (1998). Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **59**(5), 1037-46.
- Aitken R.J, Krausz C, Buckingham D. (1994). Relationship between biochemical markers for residual sperm cytoplasm, reactive oxygen species generation, and the presence of leukocytes and precursor germ cells in human sperm suspensions. *Mol. Reprod. Dev.*, **39**, 268-279.
- Aitken, R.J., Krausz, C. (2001). DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction*, **122**(4), 497-506.
- Aitken R.J., Paterson M., Fisher H., Buckingham D., Van Duin M. (1995). Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in human sperm function. *J. Cell Sci.*, **108**, 2017-2035.
- Aitken, R.J., Vermet, P. (1998). Mutation of redox regulatory mechanisms in the epididymis. *J. Reprod. Fertil.*, **53** (Suppl.), 109-18.
- Alleva, R., Scararmucci, A., Mantero, F., Boompadre, S., Leoni, L., Littarru. G.P. (1997) The protective role of ubiquinol-10 against formation of lipid peroxides in human seminal fluid. *Mol. Aspects Med.*, **18** (Suppl.), S221-S228.
- Alvarez, J.G., Touchstone J.C., Blasco, L., Storey, B.T. (1987). Spontaneous lipid peroxidation and production of lipid peroxide and superoxide in human spermatozoa, Superoxide dismutase as a major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J. Androl*, **8**, 338-348.
- Anzar, M., He,L., Buhr,M.M., Kroetsch,T.G., and Pauls K.P. (2002). Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility. *Biol. Reprod.*, **66**, 354-360.
- Auger, J., Kuntsman, J.M., Gzyglik, F., Jouannet, P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Engl. J. Med.*, **332**, 281-285.
- Baccetti, B., Collodel, G., Piomboni, P. (1996). Apoptosis in human ejaculated sperm cells (*Notulae semilogicae* 9). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, **28**, 587-596.

- Bahadur, G., Ling, K.L.E., Katz, M. (1996). Statistical modeling reveals demography and time are the main contributing factors in global sperm count changes between 1938 and 1990. *Hum. Reprod.*, **11**, 2635-2639.
- Baird, P. (1994). Un virage à prendre en douceur. *Rapport final de la Commission Royale sur les nouvelles techniques de reproduction*, **1(1)**, pp. 112-145.
- Baker, H.W.G., Brindle, J., Irvine, D.S., Aitken, R.J. (1996). Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertil. Steril.*, **65**, 411-419.
- Baker, M.A., Lewis, B., Hetherington, L., Aitken, R.J. (2003). Development of the signalling pathways associated with sperm capacitation during epididymal maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, **64(4)**, 446-57.
- Barroso, G., Morshedi M., Oehninger, S. (2000). Analysis of DNA fragmentation, plasma membrane translocation of phosphatidylserine and oxidative stress in human spermatozoa. *Hum. Reprod.*, **15**, 1338-44.
- Baumber, J., Ball, B.A., Gravoince, C.G., Medina, V., Davies-Morel, M.C.G. (2000). The effect of reactive oxygen species on sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential and membrane lipid peroxidation. *J. Androl.*, **21(6)**, 895-902.
- Becker, S. et Berhane, K. (1997). A meta-analysis of 61 sperm count studies revisited. *Fertil. Steril.*, **67**, 1103-1108
- Bendwolol, E. (1989). Semen quality in Norwegian men over a 20-year period. *Int. J. Fertil.*, **34**, 401-404.
- Blanc-Layrac, G., Bringuier, A.F., Guillot, R., Feldman, G. (2000). Morphological and biochemical analysis of cell death in human ejaculated spermatozoa. *Cell. Mol. Biol.*, **46**, 187-97.
- Blanco-Rodriguez, J., Martinez-Garcia, C. (1997). *In vivo* analysis of germ cell apoptosis reveals the existence of stage specific «social» control of germ cell death in the seminiferous epithelium. *Int. J. Androl.*, **20**, 373-9.
- Bostofte, E., Serup, J., Rebbe, H. (1982). Relation between sperm count and semen volume, and pregnancies obtained during a twenty-year follow-up period. *Int. J. Androl.*, **5**, 267-275.
- Bujan, L., et coll. (1996). Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France between 1977 and 1992. *Br. Med. J.*, **312**, 471-472.

- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Br. Med. J.*, **305**, 609-613.
- Caron, N., Veilleux, S., Boissonneault, G. (2001). Stimulation of DNA repair by the spermatidal TP1 protein. *Mol. Reprod. Dev.*, **58**, 437-443.
- Chatterjee, S., deLamirande, E., Gagnon, C. (2001). Cryopreservation alters membrane sulfhydryl status of bull spermatozoa: protection by oxidized glutathione. *Mol. Reprod. Dev.*, **60**, 498-506.
- Chatterjee, S., Gagnon, C. (2001). Production of Reactive Oxygen Species by Spermatozoa Undergoing Cooling, Freezing and Thawing. *Mol. Reprod. Dev.*, **59**, 451-458.
- Chen, X.J., Enerback, L. Immature peritoneal mast cells in neonatal rats express the CTMC phenotype, as well as functional IgE receptors. *APMIS*, **107(10)**, 957-65
- Comhaire, F.H., Christophe, A.B., Zalata, A.A., Dhooze, W.S., Mahmoud, A.M., Depuydt, C.E. (2000). The effects of combined conventional treatment, oral antioxidants and essential fatty acids on sperm biology in subfertile men. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.*, **63(3)**, 159-65.
- Conte, G., Milardi, D., De Marinis, L., Mancini, A. (1999). Reactive oxygen species in male infertility. Review of literature and personal observations. *Panminerva Med.*, **41(1)**, 45-53.
- Dandekar, S.P., Nadkarni, G.D., Kulkarni, V.S., Puneekar, S. (2002). Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in male infertility. *J. Postgrad. Med.*, **48(3)**, 186-89.
- Debbasch, C., de Saint Jean, M., Pisella P.-J., Rat P., Warnet, J.-M., Baudouin C. (1999). Cytotoxicité des ammoniums quaternaires sur une lignée de cellules conjonctivales humaines. *J. Fr. Ophtamol.*, **22**, 950-958.
- De Lamirande, E., Gagnon, C. (1991) Quantitative assessment of the serum-induced stimulation of human sperm motility. *Int J Androl.*, **14(1)**, 11-22
- De Lamirande, E., Gagnon, C. (1992a). Reactive oxygen species and human spermatozoa I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J. Androl.*, **13**, 368-378.
- De Lamirande, E., Gagnon, C. (1992b). Reactive oxygen species and human spermatozoa II. Depletion of adenosine triphosphate plays an important role in the inhibition of sperm motility. *J. Androl.*, **13**, 379-386.
- De Lamirande, E., Gagnon, C. (1993a). A positive role for the superoxide anion in the triggering of human sperm hyperactivation and capacitation. *Int. J. Androl.*, **16**, 21-25.

- De Lamirande, E., Gagnon, C. (1993b). Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic. Biol. Med.*, **14**, 157-163.
- De Lamirande, E., Gagnon, C. (1995a). Capacitation-associated production of superoxide anion by human spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med.*, **18**, 487-495.
- De Lamirande, E., Gagnon, C. (1995b). Impact oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum. Reprod.*, **10**, 115-21.
- De Lamirande, E., Gagnon, C. (1998). Paradoxical effect of reagents for sulfhydryl and disulfide groups on human capacitation and superoxide production. *Free Radic. Biol. Med.*, **25**, 803-817.
- De Lamirande E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H., Gagnon C. (1997a), Reactive oxygen species and sperm physiology. *Rev. Reprod.*, **2**, 48-54.
- De Lamirande, E., Leclerc, P., Gagnon, C. (1997b). Capacitation as regulatory event that primes spermatozoa for the acrosome reaction and fertilization. *Mol. Hum. Reprod.*, **3**, 175-194.
- De Lamirande, E., Gagnon, C. (1999). The dark and bright sides of reactive oxygen species on sperm function in the male gamete: from basic science to clinical application. *Cache River Press, Vienna, USA*, p. 516.
- De Lamirande, E., Harakat, A., Gagnon, C. (1998a). Human sperm capacitation induced by biological fluids and progesterone, but not by NADH or NADPH, is associated with the production of superoxide anion. *J. Androl.*, **19**, 215-225.
- De Lamirande, E., Tsai, C., Harakat, A., Gagnon, C. (1998b). Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *J. Androl.*, **19**, 585-594.
- Donnelly, E.T., Lewis, S.E.M., Thompson, W., Chakravarty, U. (1997). Sperm nitric oxide and motility: the effects of nitric oxide synthase stimulation and inhibition. *Mol. Hum. Reprod.*, **3**, 755-762.
- Donnelly, E.T., McClure, N., Lewis, E., M. (1999). The effect of acrobat and  $\alpha$ -tocopherol supplementation *in vitro* on DNA integrity and hydrogen peroxide-induced DNA damage in human spermatozoa. *Mutagenesis*, **14** (5), 505-511.
- Donnelly, E.T., McClure, N., Lewis, S.E. (2000). Glutathione and hypotaurine in vitro: effects on human sperm motility, DNA integrity and production of reactive oxygen species. *Mutagenesis*, **15**(1), 61-8.

- Drews, U. (1998). Atlas de poche d'embryologie, *Flammarion Médecine Science*, Paris, p.38
- Duty, S.M., Singh, N.P., Ryan, L., Chen, Z., Lewis, C., Hueng, T., Houser, R. (2001). Reliability of the comet assay in cryopreserved human sperm. *Hum. Reprod.*, **17**(5), 1274-1280.
- Evenson, D.P., Larson, K.L., Jost, L.K. (2002). Sperm chromatin structure assay: its clinical use for detecting sperm DNA fragmentation in male infertility and comparisons with other techniques. *J. Androl.*, **23**(1), 25-43.
- Ford, W.C., Whittington, K., Williams A.C. (1997). Reactive oxygen species in human sperm suspensions: production by leukocytes and the generation of NADPH to protect sperm against their effects. *Int. J. Androl.*, **20** (Suppl. 3), 44-49.
- Ford, W.C.L., Whittington, K. (1998). Antioxidant treatment for male subfertility: a promise that remains unfulfilled. *Hum. Reprod.*, **13**, 1416-1419.
- Fox, N.S., Reijo Pera, R.A. (2002). Male infertility, genetic analysis of the DAZ genes on the human Y chromosome and genetic analysis of DNA repair. *Mol. Cel. Endocrinol.*, **186**, 231-239.
- Fraga, C.G., Motchnik, P.A., Wyrobek, A.J., Rempel, D.M. (1996). Smoking and low antioxidant levels increase oxidative damage to sperm DNA. *Mutat. Res.*, **351**, 199-203.
- Gandini, L., Lombardo, F., Paoli, D., Caponecchia, L., Familiari, G., Verlengia, C., Dondero, F., Lenzi, A. (2000). Study of apoptotic DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod.*, **15**(4), 830-839.
- Gavella, M., Lipovac, V., Sverko, V. (1995). Superoxide anion production and some sperm-specific enzyme activities in infertile men. *Andrologia*, **27**, 7-12.
- Gil-Guzman, E., Ollero, M., Lopez, M.C., Sharma, P.K., Alvarez, J.G., Thomas, A.J.Jr., Agarwal, A. (2001). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum. Reprod.*, **16**(9), 1922-1930.
- Godeas, C., Tramer, F., Micali, F., Soranzo, M., Sandri, G., Panfili, E. (1997). Distribution and possible role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in rat epididymal spermatozoa. *Biol. Reprod.*, **57**, 1502-1508.
- Gomez, E., Buckingham, D.W., Brindle, J., Lanzafame, F., Irvine, Aitken, R.J., L. (1996). Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J. Androl.*, **17**, 276-287.

- Gorczyca, W., Traganos, F., Jesionowska, H., Darzynkiewicz, Z. (1993). Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: an analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp. Cell Res.*, **207**, 205-5.
- Green, D.R., Reed, J.C. (1998) Mitochondria and apoptose. *Science*, **281 (5381)**, 1309-1312
- Griveau, J.F, Grizard, G., Boucher D., Le Lannou. (1998). Influence of oxygen tension on function of isolated spermatozoa from ejaculates of oligozoospermic patients and normozoospermic fertile donors. *Hum. Reprod.*, **13(11)**, 3108-3113.
- Griveau, J.F., LeLannou, D. (1997). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiologie and pathology. *Int. J. Androl.*, **20**, 61-69.
- Griveau, J.F., Dumont, D., Renard P., Callegari, J.P., LeLannou, D. (1995). Reactive oxygen species, lipid peroxidation and enzymatic defense systems in human spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.*, **103**, 17-26.
- Halliwell, B., Gutteridge J.M.(1989). Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin. Haematol.*, **2(2)**, 195-256.
- Hassinen, I. (1986). Optical monitoring of mitochondrial membrane potential in intact myocardium and its application to the development of tissue injury caused by calcium readmission to the isolated perfused heart. *Adv Exp Med Biol.*, **200**, 531-538.
- Herrero, M., B., de Lamirande, E., Gagnon, C. (2003) Nitric oxide is a signaling in spermatozoa. *Curr. Pharm. Dev.*, **9(5)**, 419-25.
- Herrero, M., B., Chatterjee, S., Lefievre, L., de Lamirande, E., Gagnon, C. (2000). Nitric oxide interacts with the cAMP pathway to modulate capacitation of human spermatozoa. *Free Radic. Biol. Med.*, **29 (6)**, 522-536.
- Herrero, M., B., de Lamirande, E., Gagnon, C. (2001). Tyrosine nitration in human spermatozoa: physiological function of peroxynitrite, the reaction product of nitric oxide and superoxide. *Mol. Hum. Reprod.*, **7(10)**, 913-921.
- Hideg, E., Barta, C., Kalai, T., Vass, I., Hideg, K., Assadak (2002). Detection of singlet oxygen and superoxide with fluorescent sensors in leaves under stress by photoinhibition or UV radiation. *Plant Cell. Physiol.*, **43(10)**, 1154-1164.
- Host, E., Lindenberg, S., Smidt-Jensen, S. (2000). DNA stand breaks in human spermatozoa: correlation with fertilization in vitro in oligozoospermic men and in men with unexplained infertility. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, **79**, 189-193.



- Hseih, Y.Y., Sun, Y.L., Chang, C.C., Lee, Y.S., Tsai, H.D., Lin, C.S. (2002). Superoxide dismutase activities of spermatozoa and seminal plasma are not correlated with male infertility. *J. Clin. Lab. Anal.*, **16**(3), 127-31.
- Hughes, E.G., Lewis, S.E.M., McKelvey-Martin, V.J., Thompson, W. (1998). The effect of antioxidant supplementation during Percoll preparation on human sperm DNA integrity. *Hum reprod*, **13**, 1240-1247.
- Hull, M.G.R. (1992). The causes of infertility and relative effectiveness of treatment. In: Templeton A.A., Drife, J.O. eds. *Infertility. Springer-Verlag, Berlin*, pp. 33-57.
- Hussain, M., Z., Khan, A.G. (1971). Possible hazard in use of gentian violet. *British. Med. J.*, 701-703
- Iatskovskii A.N.(1987). Method of estimating the functional avctivity of sell nuclei. *Arkh Anat. Gistol. Embriol.*, **1**, 76-9.
- Irvine, D.S., Twigg, J.P., Gordon, E.L., Fulton, N., Milne, P.A., Aitken, R.J. (2000). DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J. Androl.*, **21**(1), 33-44.
- Iwasaki, A., Ganon, C. (1992). Formation of reactive oxygen species in spermatozoa of infertile patients. *Fertil. Steril.*, **57**, 409-416.
- Johnson, M.H., Everitt, B.J. (2002). Reproduction. *De Boeck Université, Bruxelles*, pp. 298.
- Jones, R., Mann, T. and Sherins, R.J. (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa: spermicidal effects of fatty acid peroxides and protective action of seminal plasma. *Fertil. Steril.*, **31**, 531-537.
- Kauppinen, R.A., Hassinen, I. E. (1984) Monitoring of mitochondrial membrane potential in isolated perfused rat heart. *Am. J. Physiol*, **247** (4pt2), H508-516.
- Kerr, N.J., Zhang, J., Sin, F.Y. (2000). Frequency of microdeletions in the azoospermia factor region of the Y-chromosome of New Zealand men. *Med. J.*, **113**, 468-470.
- Kierszenbaum, A.L. (2001). Apoptosis during spermatogenesis: the thrill of being alive, *Mol. Reprod. Dev.*, **58**, 1-3.
- Kobayashi, H., Gil-Guzman, E., Manrom, A.M., Sherma, R.K., Nelson, D.R., Thomas, A.J. Jr, Agarwal, A. (2002). Quality control of reactive oxygen species measurement by luminol-dependent chemiluminescence assay. *J. Androl.*, **22**(4), 568-574.

- Kovalski, N., N., de Lamirande, E., Gagnon, C. (1992). Reactive oxygen species generated by human neutrophils inhibit sperm mobility : protective effect of seminal plasma and scavengers. *Fertil. Steril.*, **58**, 809-815.
- Krausz, C. et McElreavey, K. (1999). Y chromosome and male infertility. *Front. Biosci.*, **4**, 1-8.
- Lee, J., Richburg, J., Younkin, S., Boekelheide, K. (1997). The Fas System is a key regulator of germ cell apoptosis in the testis. *Endocrinology*, **138**, 2081-8.
- Levy, R., I., Seifer-Akmin (2001). Place de l'apoptose au cours de la spermatogenèse et dans le sperme éjaculé : relations avec la fécondation. *Ann. Biol. Clin.*, **59**, 531-543.
- Lopes, S., Jurisicora, A., Casper, R. (1998). Gamatespecific DNA fragmentation in unfertilized human ovocytes after intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.* **13**(3), 703-708.
- Macomber, D., Sanders, M.B. (1999). The spermatozoa count: Its value in the diagnosis, prognosis and treatment of sterility. *N. Eng. J. Med.*, **100**, 981-984.
- Marik, J.J. (2000). Antioxidants and male infertility. *Fertil. Steril.*, **73**(5), 1065-6.
- Martin-Du Pan, R.C., Sakkas, D. (1998). Is antioxidant therapy a promising strategy to improve human reproduction? Are anti-oxidants useful in the treatment of male infertility? *Hum. Reprod.*, **13**(11), 2984-85.
- Mc Kenney, K.A., Lewis, S.E., Thompson, W. (1996). Reactive oxygen species generation in human sperm: luminol and lucigenin chemiluminescence probes. *Archives of Andrology*, **36**, 119-125.
- Miranda-Vizuete, A., Ljung, J. Damdimopoulos, A. E., Gustafsson, J-A., Oko, R., Pelto-Huikko, M., Spyrou G. (2001). Characterization of Sptx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *J. Biol.Chem.*, **276**(34), 31567-31574.
- Murphy, H.E., Sies, H. (1990). Visible range low-level chemiluminescence in biological systems. *Methods Enzymol.*, **186**, 595-610.
- Negre-Salvayre, A., Auge, N., Duval, C., Robbesyn, F., Thiers, J.C., Nazzari, D., Benoist, H., Salvayre, R. (2002). Detection of intracellular reactive oxygen species in cultured cells using fluorescent probes. *Methods Enzymol.*, **352**, 61-71.
- Ochsendorf, F.R. (1999). Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum. Reprod. Update*, **5**, 399-420.

- Ollero, M., Gil-Guzman, E., Lopez, M., Sharma, K., R., Agarwal, A., Larson, K., Evenson, D., Thomas, J., A., Alvarez, J., G. (2001). Characterization of subsets of human spermatozoa at different stages of maturation: implications in the diagnosis and treatment of male infertility. *Hum. Reprod.*, **16** (9), 1912-1921.
- Omu, A.B., Fatinikum, T., Mormazhath, N. and Abraham, S. (1999). Significance of simultaneous determination of serum and seminal plasma L-tocopherol and retinol in infertile men by high-performance liquid chromatography. *Andrologia*, **31**, 347-354.
- Oosterhuis, G.J., Mulder, A.B., Kalsbeek-Batenburg, E., Lambalk, C.B., Schoemaker, J., Vermes, I. (2000). Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? *Fertil. Steril.*, **74**, 245-50.
- Pasqualotto, F.F., Sharma, R.K., Nelson, D.R., Thomas, A.J., Agarwal, A. (2000). Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil. Steril.*, **73**(3), 459-64.
- Penttinen, V., Erkkila, K., Dunkel, L. (1999). Fas regulates cell apoptosis in the human testis in vitro, *Am. J. Physiol.*, **276**, E310-6.
- Plante M., de Lamirande E., Gagnon, C. (1994). Reactive oxygen species released by activated neutrophils, but not by deficient spermatozoa, are sufficient to affect normal sperm motility. *Fertil. Steril.*, **62**(2), 387-393.
- Pasqualotto, F.F., M.D., Sharma, R.K., Nelson, D.R., Thomas, A.J., Agarwal, A. (2000). Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil. Steril.*, **73**(3), 459-464.
- Pastore, D., Fratianni, A., Di Pede, S., Passarella, S. (2000). Effects of fatty acids, nucleotides and reactive oxygen species on durum wheat mitochondria. *FEBS Letters*, **470**, 88-92.
- Pastore, D., Laus, M.N., Fonzo N.D. S., Passarella, S. (2002). Reactive oxygen species inhibit the succinate oxidation-supported generation of membrane potential in wheat mitochondria. *FEBS Letters*, **516**, 15-19.
- Pham, N.A., Robinson, B.H., Hedley, D.W. (2000). Simultaneous detection of mitochondrial respiratory chain activity and reactive oxygen in digitonin-permeabilized cells using flow cytometry. *Cytometry*, **41**(4), 245-251.
- Potts, J.R., Newbury, C.J., Smith, G., Notarianni, J.J., Jefferies, T.M. (1999). Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutation Research*, **423**, 103-111.
- Rodriguez-Martinez, H., Ekwall, H. (1998). Electron microscopy in the assessment of cryopreserved spermatozoa viability, *The Americas Microscopy and Analysis*, 11-13.

- Rosenkrang, H.S., Carr, H.S. (1971). Possible hazard in use of gentian violet. *British Medical J.*, 16-19.
- Roychowdhury, S., Luthe, A., Keilhoff, G., Wolf, G., Horn, T.F. (2000). Oxidative stress in glial cultures: detection by DAF-2 fluorescence used as a tool to measure peroxynitrite rather than nitric oxide. *Glia*, **38**(2), 133-114.
- Royere, D., Barthelemy, C., Hamamah, S., Lansac, J. (1996). Cryopreservation of spermatozoa. *Hum. Reprod.*, **2**, 553-559.
- Sakkas, D., Mariethoz, E., Manicardi, G., Manicardi, G., Bizzaro, D., Bianchi, P.G., Bianchi, U. (1999a). Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev. Reprod.*, **4**, 31-7.
- Sakkas, D., Mariethoz, E., St-John, J.C. (1999b). Abnormal sperm parameters in human are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the fas-mediated pathway, *Exp. Cell Res*, **251**, 50-5.
- Sakkas, D., Urner, F., Bizzaro, D., Manicardi, G., Bianchi, P.G., Shoukir, Y., Compand, A. (1998). Sperm nuclear DNA damage and altered chromatin structure: effect on fertilization and embryo development. *Hum. Reprod.*, **13**(4), 11-19.
- Salat-Baroux, J., Mandelbaum, J., Merveil, P. (1998). L'ICSI: le traitement moderne des stérilités masculines, *Masson*, Paris.
- Saleh, R., Agarwal A., Kandirali, E. (2002). Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil. Steril.*, **78**(6), 1215-1224.
- Shen, H.M., Chia, S.E., Ni, Z.Y., New, A.L., Lee, B.L., Ong, C.N. (1997). Detection of oxidative DNA damage in human sperm and its association with cigarette smoking. *Reprod. Toxicol.*, **11**, 675-680.
- Shen, H.M., Chia, S.E., Ong, C.N. (1999). Evaluation of oxidative DNA damage in human sperm and its association with male infertility. *J. Andol.*, **20**(6), 718-723.
- Shen, H.-M., Dai, J., Chia, S.-E., Lim, A., Ong, C.-N. (2002). Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. *Hum. Reprod.*, **17**(5), 1266-1273.
- Sergerie, M., Ouhilal, S., Bissonnette, F., Brodeur, J., Bleau, G. (2000). Lack of association between smoking and DNA fragmentation in the spermatozoa of normal men. *Hum. Reprod.*, **15** (6), 1414-1321.

- Sharma, R.K., Pasqualotto, F.F., Nelson, D.R., Thomas, A.J. Jr. Agarwal, A. (1999) The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum. Reprod.*, **14**, 2801-2807.
- Sharma, R.K., Agarwal, A.(1996). Role of oxygen species in male infertility. *Urology*, **48(6)**, 835-50.
- Shen, H.-M., Ong, C.O.N. (2000). Detection of oxidative DNA Damage in human sperm and ITS association with sperm function and male infertility. *Free Radic. Biol.*, **28(4)**, 529-536.
- Shi, Q., Ko., E., Barclay, L., Hoang, T., Rademaker, A., Martin, R. (2001). Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. *Mol. Reprod. Dev.*, **59(4)**, 417-421.
- Siciliano, L., Tarantino, P., Longobardi, F., Rago, V., De Stefano, C., Carpino, A. (2001). Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *J. Androl.*, **22(5)**, 798-803.
- Sikka, S.C. (2001). Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. *Curr. Med. Chem.*, **8(7)**, 851-62.
- Snow, E.T. (1997). The role of DNA repairs in development. *Reprod. Toxicol.*, **11**, 353-365.
- Sofikitis, N., Miyagawa, I., Dimitriadis, D., Zavos, P., Sikka, S., Hellstrom, W. (1995). Effects of smoking on testicular function, semen quality and sperm fertilizing capacity. *J. Urol.*, **154(3)**, 1030-4.
- Schmidt, L., Münster, K.R., Helm, P. (1995). Infertility and the seeking of infertility treatment in a representative population, *Brit. J. Obstet. Gynaecol.*, **102(12)**, 978-984.
- Steele, V.E., McClure, N., Lewis, S.E.M. (2000). Comparison of the effects of two methods of cryopreservation on testicular sperm DNA. *Fertil. Steril.*, **74**, 3.
- Stephanson, C.J., Stephanson, A.M., Flanagan, G.P. (2002). Antioxidant capability and efficacy of Mega-H by in vitro cellular analysis using photosensitization and fluorescence detection. *J. Med. Food*, **5(1)**, 10-16.
- Sternheimer R., Malbin, B. ( 1951). Clinical recognition of pyelonephritis, with a new stain for urinary sediments. *American journal of medicine*, 312-323.
- Sun, J.G., Jurisicova, A., Casper, R.F. (1997). Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. *Biol. Reprod.*, **56**, 602-607.

- Surai, P.F., Brillard, J.P., Speake, B.K., Blesbois, E., Seigneurin, F., Sparks, N.H. (2000). Phospholipid fatty acid composition, vitamin E content and susceptibility to lipid peroxidation of duck spermatozoa. *Theriogenology*, **53**(5), 1025-1039.
- Swain D., De D.N. (1990). Differential staining of the cell cycle of plant cells using safranin and indigo-picrocarmine. *Stain. Technol.*, **65**(4), 197-204.
- Swan, S.H., Elkin, E.P., Feenster, L. (1997). Have sperm densities declined? A re-analysis of global trend data. *Environ. Health Perspect.*, **106**, 1228-1232.
- Templeton, A.A. (1992). The epidemiology of infertility. In : Templeton A.A., Driffe J.O., eds. *Infertility, Springer-Verlag*, Berlin, pp. 23-24.
- Terada, Y., Luetjens, C.M., Sutovsky, P., Schatten, G. (2000). Atypical decondensation of the sperm nucleus, delayed replication of the male genome, and sex chromosome positioning following intracytoplasmic human sperm injection (ICSI) into golden hamster eggs: Does ICSI itself introduce chromosomal anomalies? *Fertil. Steril.*, **74**(3), 454-460.
- Tesarik, J., Greco, E., Cohen-Bacrie, P., Mendoza, C. (1998). Germ cell apoptosis in men with complete and incomplete spermiogenesis failure. *Mol. Human. Reprod.*, **4**, 757-62.
- Thibault, C., Levasseur, M-C. (2001). La reproduction chez les mammifères et l'homme, *INRA*, Paris, pp. 221-298.
- Thompson, C.B. (1995). Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, **267**, 1456-1462.
- Thonneau, P., Marchand, S., Tallec, A., Fercial, M.-L., Ducot, B., Lansac, J., Lopes, P., Tabaste, J.-M., Spira, A. (1991). Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions. *Hum. Reprod.*, **6**, 811-816.
- Tran D., Golick, M., Rabinovitz, H., Rivlin, D., Elgart, G., Nordlow, B. (1999). Hematoxylin and safranin D staining of frozen sections. *Dermatol. Surg.*, **26**(3), 197-9.
- Twigg, J.P., Irvine, D.S., Aitken, R.J. (1998a). Oxidative damage to DNA in human spermatozoa does not prelude pronucleus formation at intracytoplasmic sperm injection. *Hum. Reprod.*, **13**(7), 1864-71.
- Twigg, J.P., Irvine, D.S., Houston, P., Fulton, N., Michael, L., Aitken, R.J. (1998b). Iatrogenic DNA damage induced in human spermatozoa during sperm preparation: protective significance of seminal plasma. *Mol. Hum. Reprod.*, **4**(5), 439-445.

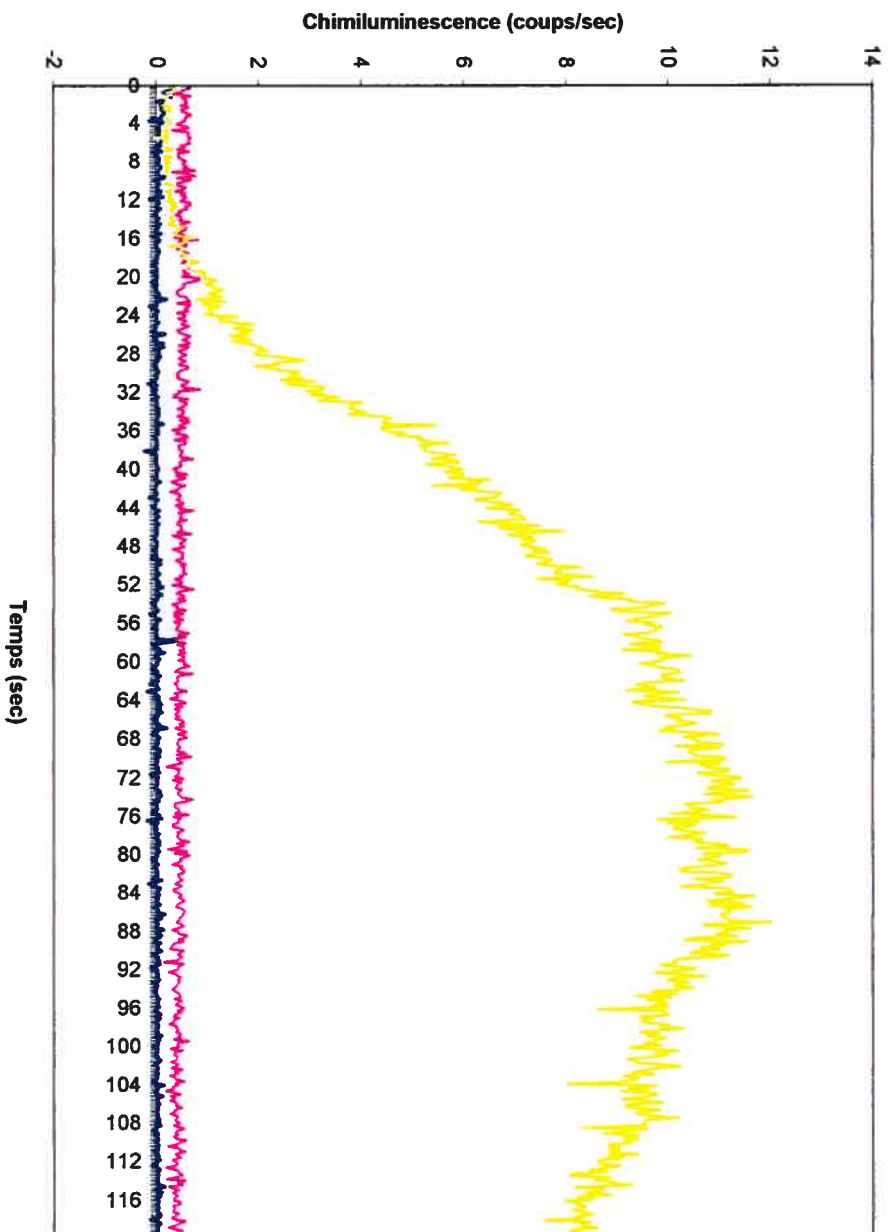
- Twigg, J., Fulton, N., Gomez, E., Irvine, D.S., Aitken, R.J. (1998c). Analysis of the impact of intracellular reactive oxygen species generation on the structural and functional integrity of human spermatozoa: lipid peroxidation, DNA fragmentation and effectiveness of antioxidants. *Hum. Reprod.*, **13**(6), 1429-36.
- Ueda, S., Nakamura, H., Masutani, H., Sasada, T., Yonehara S., Takabayashi, A., Yamaoka, Y., Yodoi, J. (1998). Redox regulation of caspases-3(-like) protease activity: regulatory roles of thioredoxin and cytochrome *c*. *J.Immunology*, **161**, 6689-6695.
- Vernet, P., Fulton, N., Wallace, C. and Aitken, R.J. (2001). Analysis of reactive oxygen species generating systems in rat epididymal spermatozoa. *Biology of Reproduction*, **65**, 1102-1113.
- Vicari, E., La Vignera, S., Calogero, A.E. (2002). Antioxidant treatment with carnitines is effective in infertile patients with prostatovesiculoe epididymitis and elevated seminal leukocyte concentrations after treatment with nonsteroidal anti-inflammatory compounds. *Fertil. Steril.*, **78**(6), 1203-1208.
- Vierula, M., Niemi, M., Keiski, A., Saaranen, M., Saarikoski, S., Suominen, J. (1996). High and unchanged sperm counts of Finnish men. *Int. J. Androl.*, **19**(1), 11-17.
- Vine, M.F., Setzer, R.W. Jr, Evenson, R.B., Wyrobek, A.J. (1997). Human sperm morphometry and smoking, caffeine, and alcohol consumption. *Reprod. Toxicol.*, **11**(2-3), 179-184.
- Voet, D., Voet, G.V. Biochimie. (1998). *De Boeck Universiteit*, Bruxelles, p.879.
- Vogt, P.H., Edelman, A., Kirsch, S. (1996). Cigarette smoking and semen quality. *Fertil. Steril.*, **65**, 835-842.
- Wade, M.A., Jones, R.C., Nurdoch, R.N., Aitken, R.J. (2003). Motility activation and second messenger signaling in spermatozoa from rat cauda epididymidis. *Reproduction*, **125**(2), 175-83.
- Wood S., Thomas, K., Schnauffer, K., Troup, S., Kingsland, C., Lewis-Jones, I. (2002). Reproductive potential of fresh and cryopreserved epididymal and testicular spermatozoa in consecutive intracytoplasmic sperm injection cycles in the same patients. *Fertil. Steril.*, **77**(6), 1162-6.
- World Health Organization (1992). WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. *Cambridge University Press*. Cambridge.
- Zini, A., Bielecki, R., Phang, D., Zenzes, M.T. (2001). Correlations between two markers of sperm DNA integrity, DNA denaturation and DNA fragmentation in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.*, **75**(4), 674-677.

## **ANNEXE 1 :**

*Tracés des mesures de chimiluminescence des cellules du sperme, induite par le PMA,  
en fonction du temps*

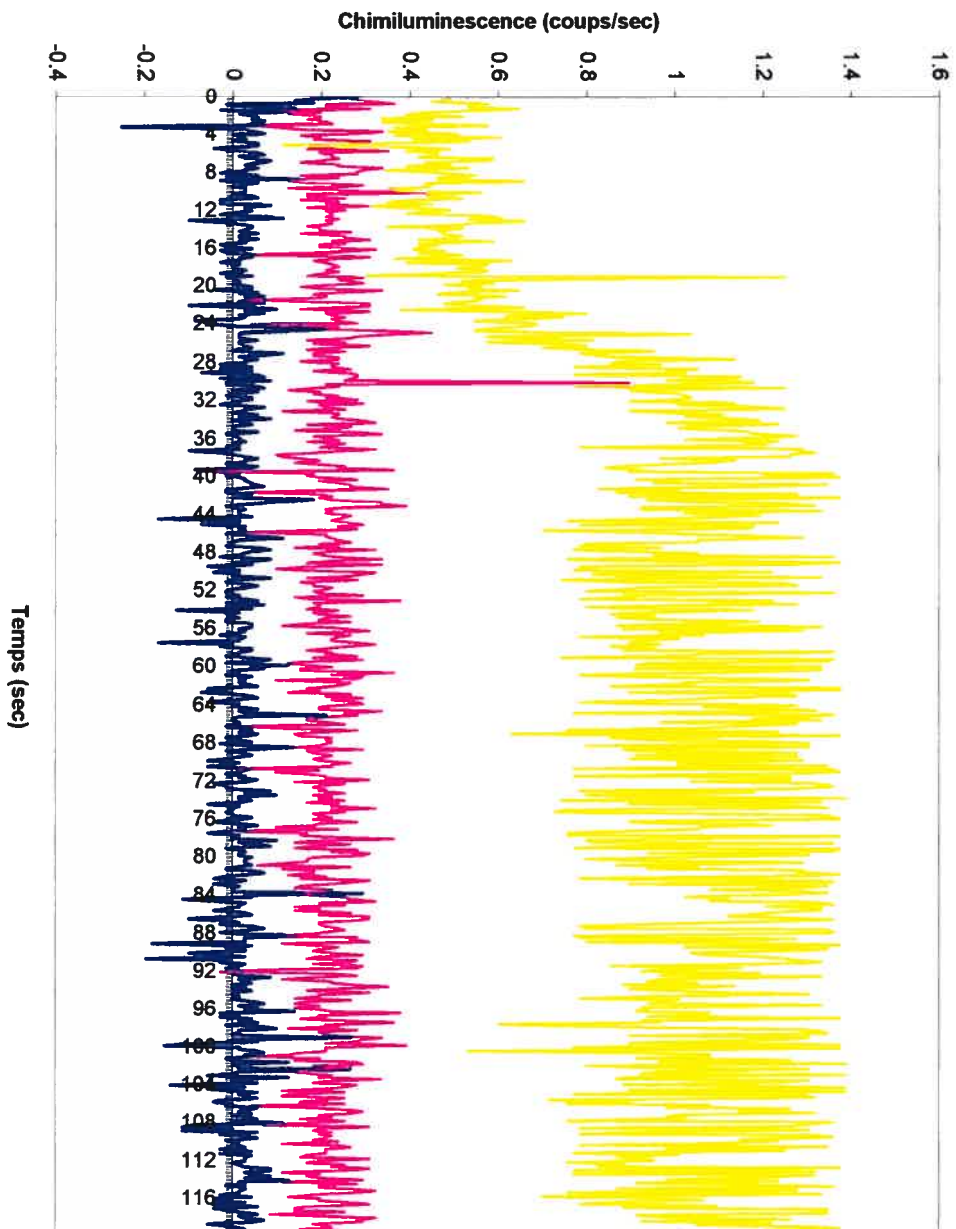


## Sujet 10B



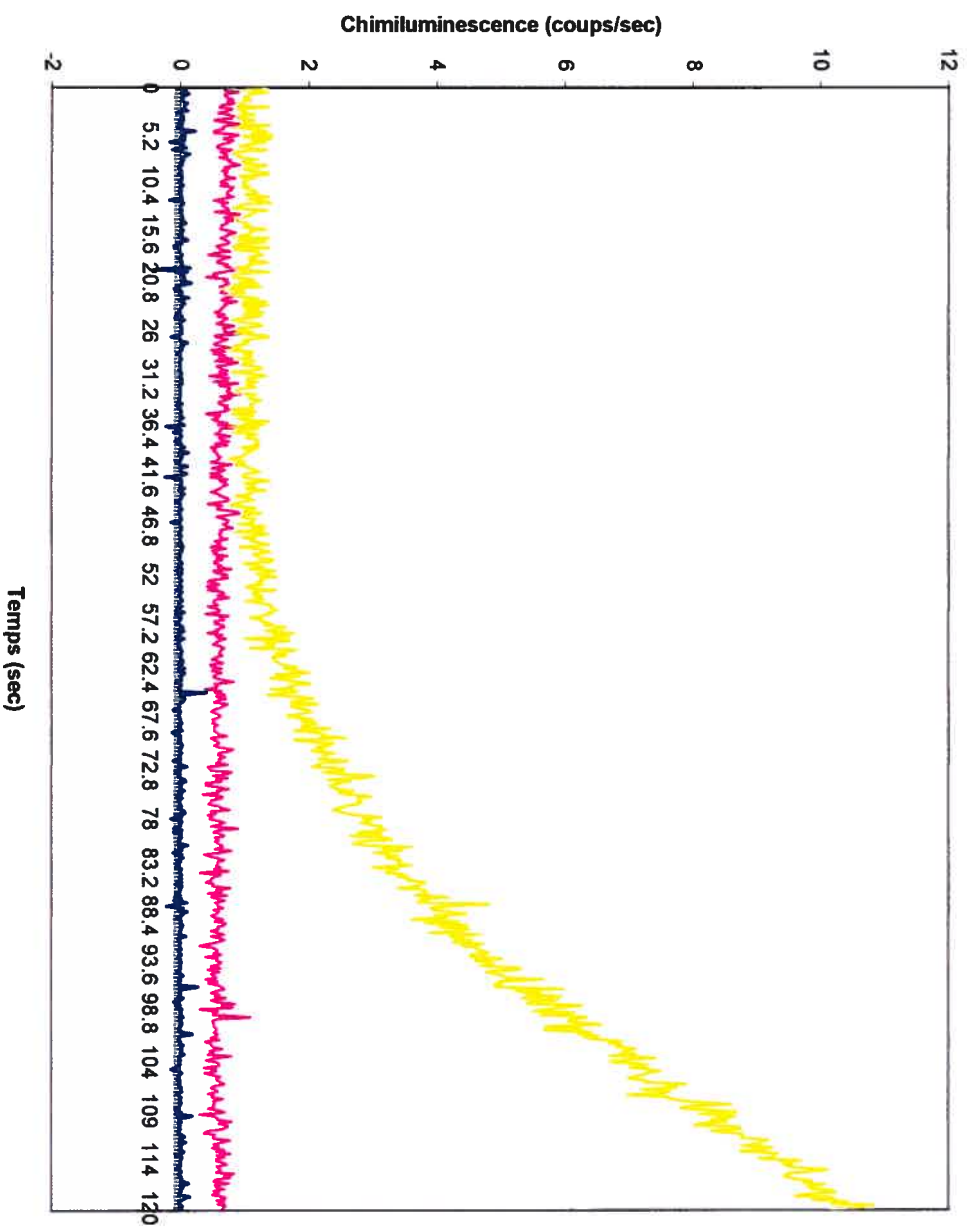
- Cellules seules (0,021)
- Cellules avec luminol (0,464)
- Cellules avec luminol et PMA (6,868)

## Sujet 11B



- Cellules seules (0,019)
- Cellules avec luminol (0,218)
- Cellules avec luminol et PMA (0,948)

## Sujet 14B

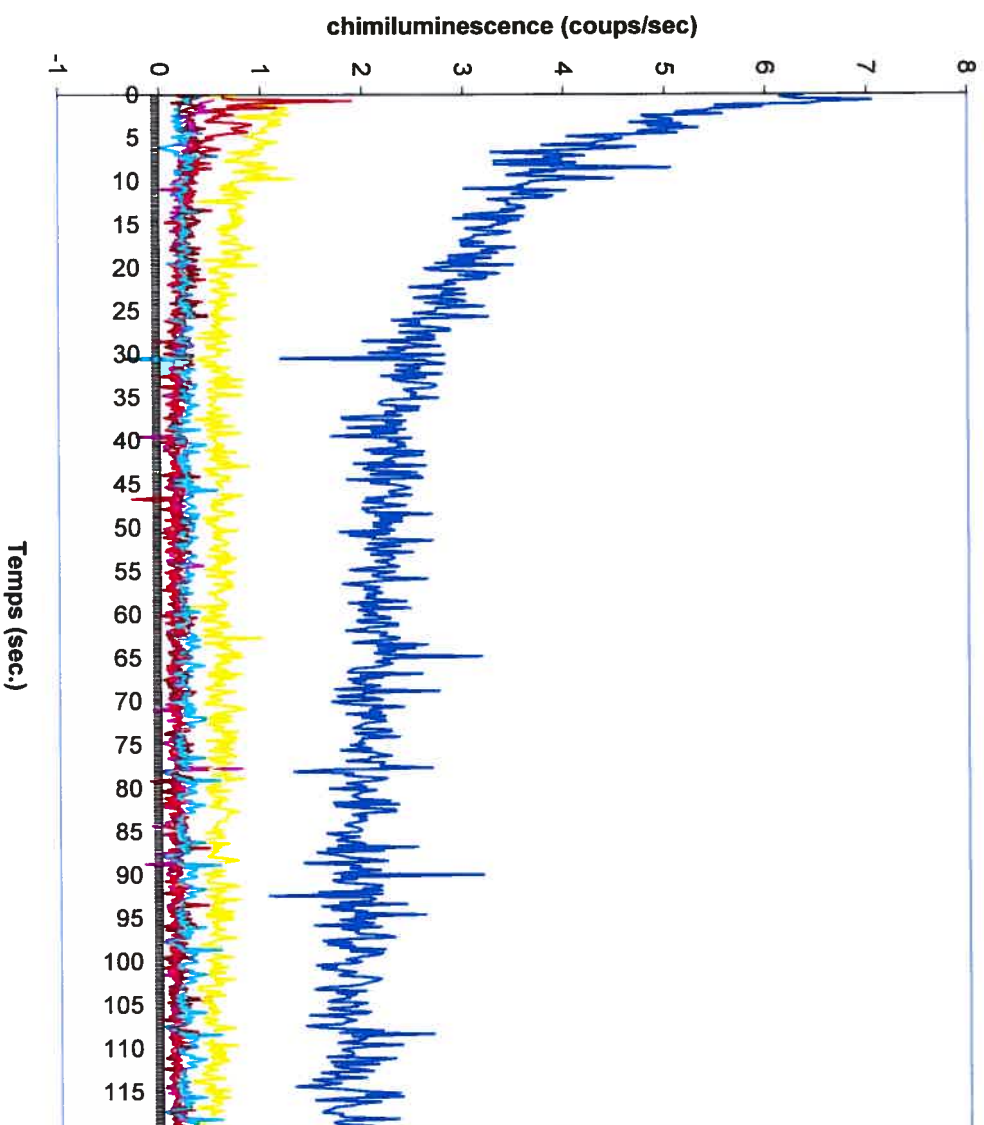


- Celules seules (0,029)
- Celules avec luminol (0,619)
- Celules avec luminol et PMA (3,042)

## **ANNEXE 2 :**

*Tracés des mesures de chimiluminescence des cellules du sperme, induite par  
le NADPH, en fonction du temps*

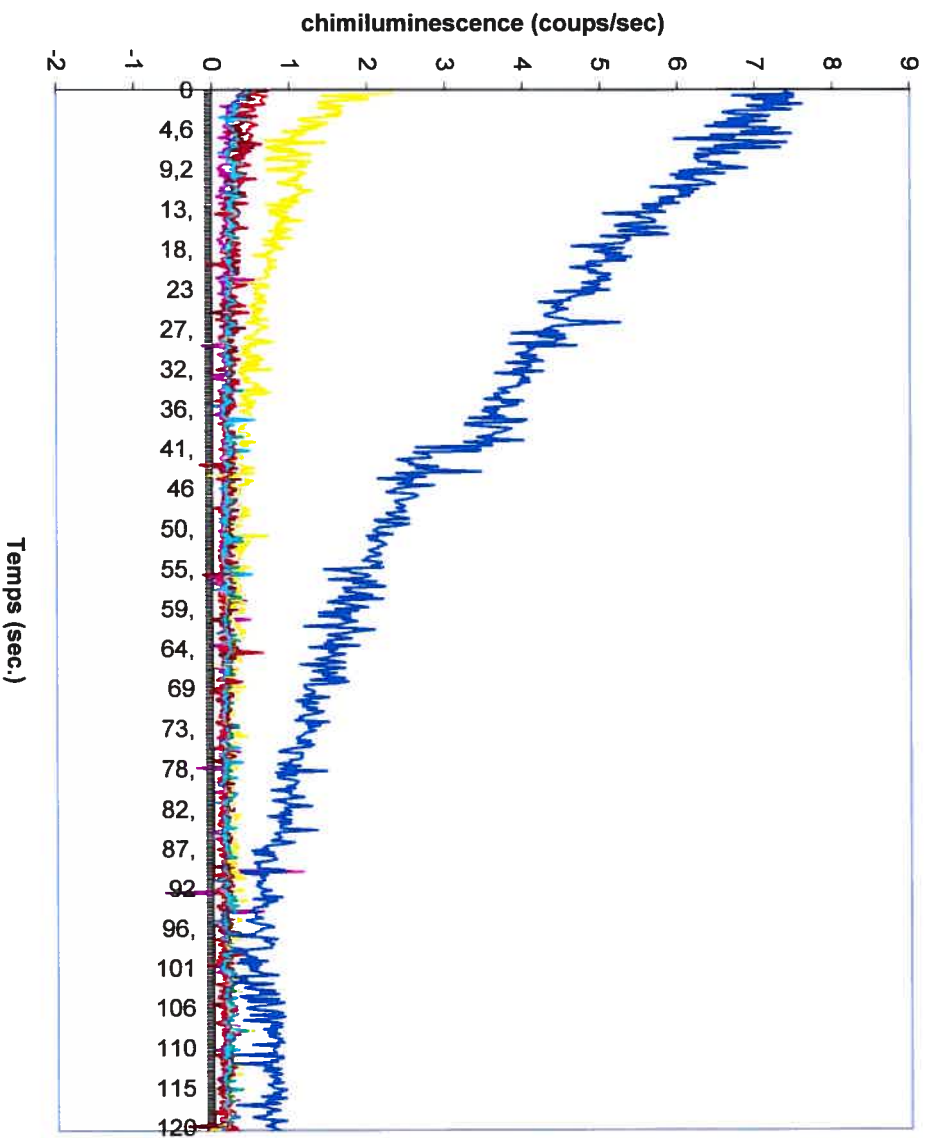
## Sujet 1N



Spermatozoïdes lavés avec 1mM  
 $\text{NaHCO}_3$  et 0.34M sucrose

- Cellules seules (0.18)
- Cellules avec luminol et Triton X100 (0.16)
- Cellules avec luminol, Triton X100 et NADPH (0.62)
- Cellules avec luminol (0.2)
- Cellules avec luminol et MKF (0.24)
- Cellules avec luminol, MKF et NADPH (2.62)

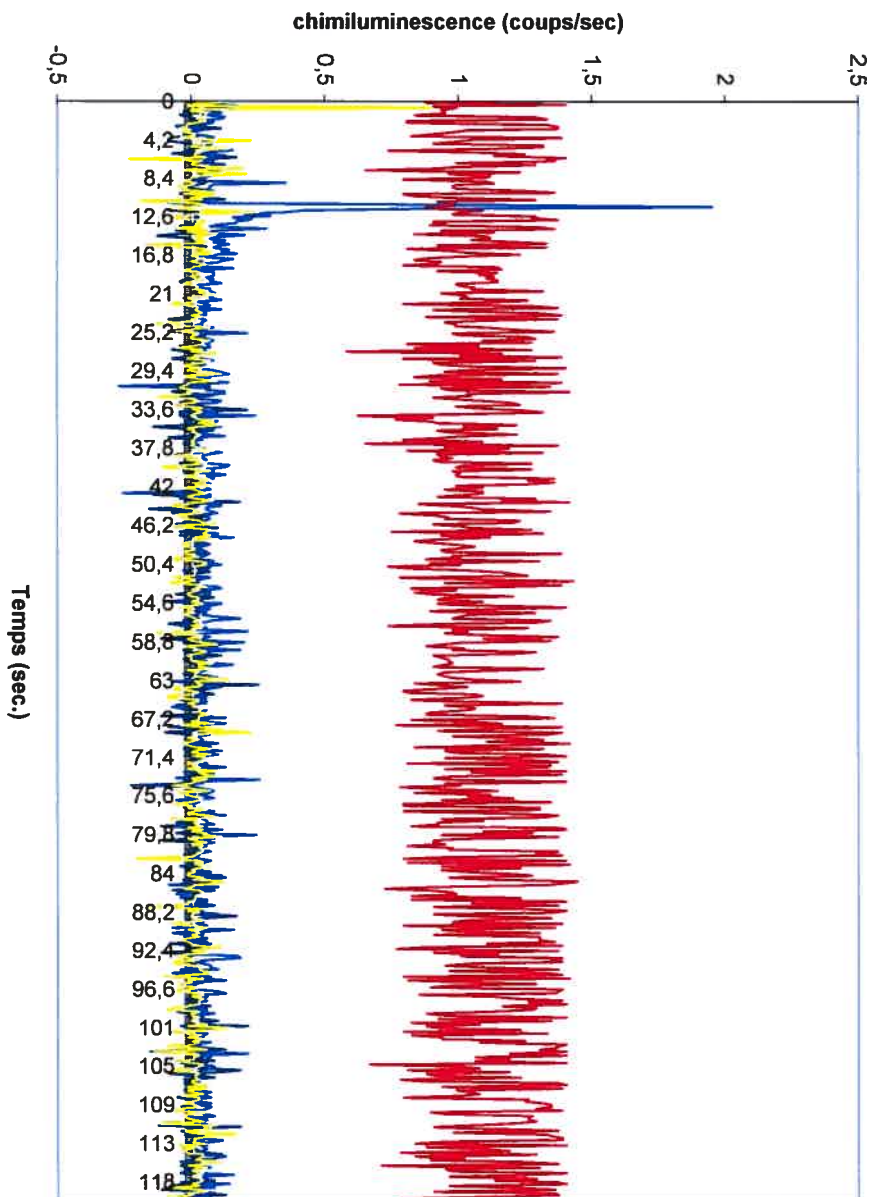
## Sujet 1N



Spermatozoïdes isolés  
sur gradient de Percoll

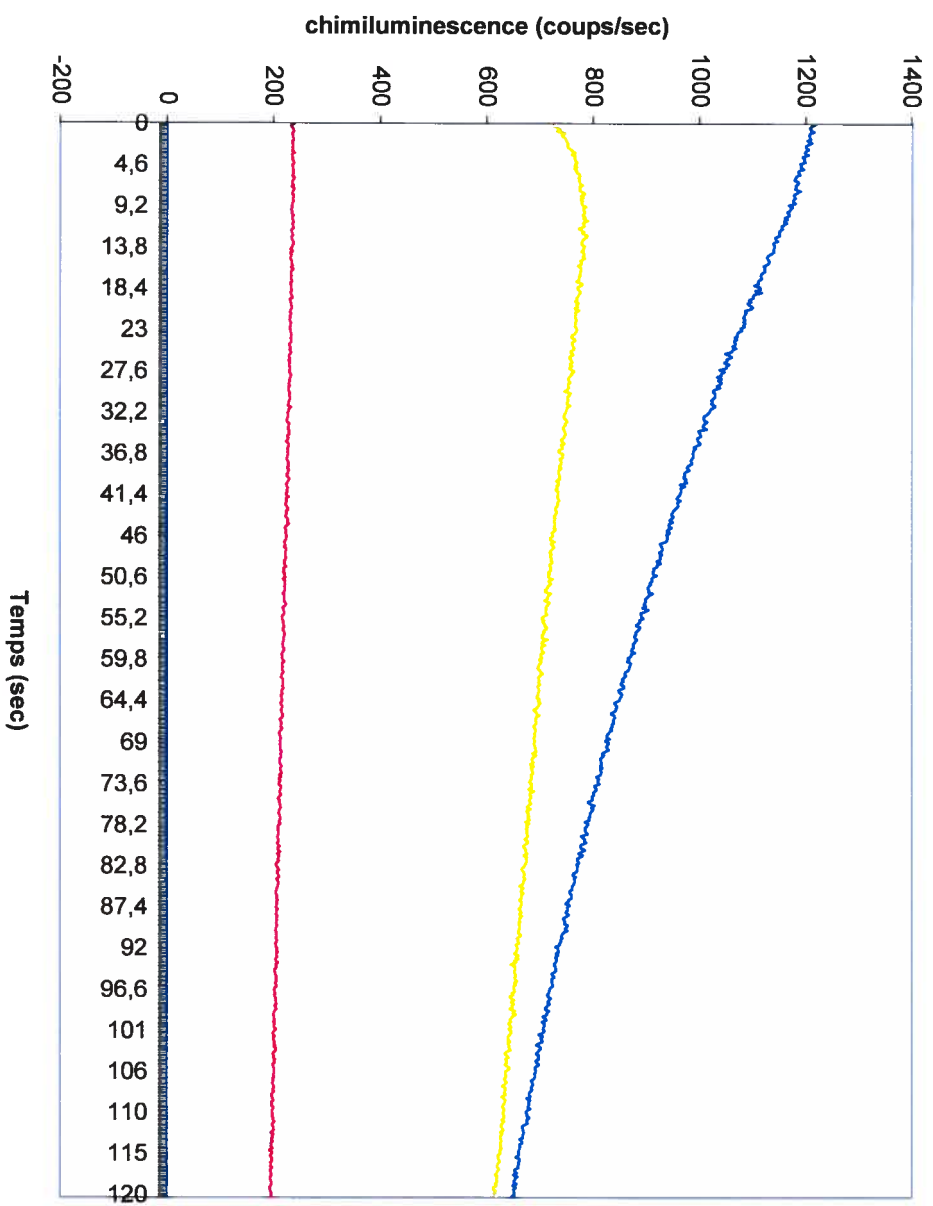
- Cellules seules (0.21)
- Cellules avec luminol et Triton X100 (0.16)
- Cellules avec luminol, Triton X100 et NADPH (0.47)
- Cellules avec luminol (0.2)
- Cellules avec luminol et MKF (0.21)
- Cellules avec luminol, MKF et NADPH (2.58)

## Sujet 2N



- Cellules seules (0.013)
- Cellules avec luminol (0.056)
- Cellules avec luminol et MKF (0.016)
- Cellules avec luminol, MKF et NADPH (1.089)

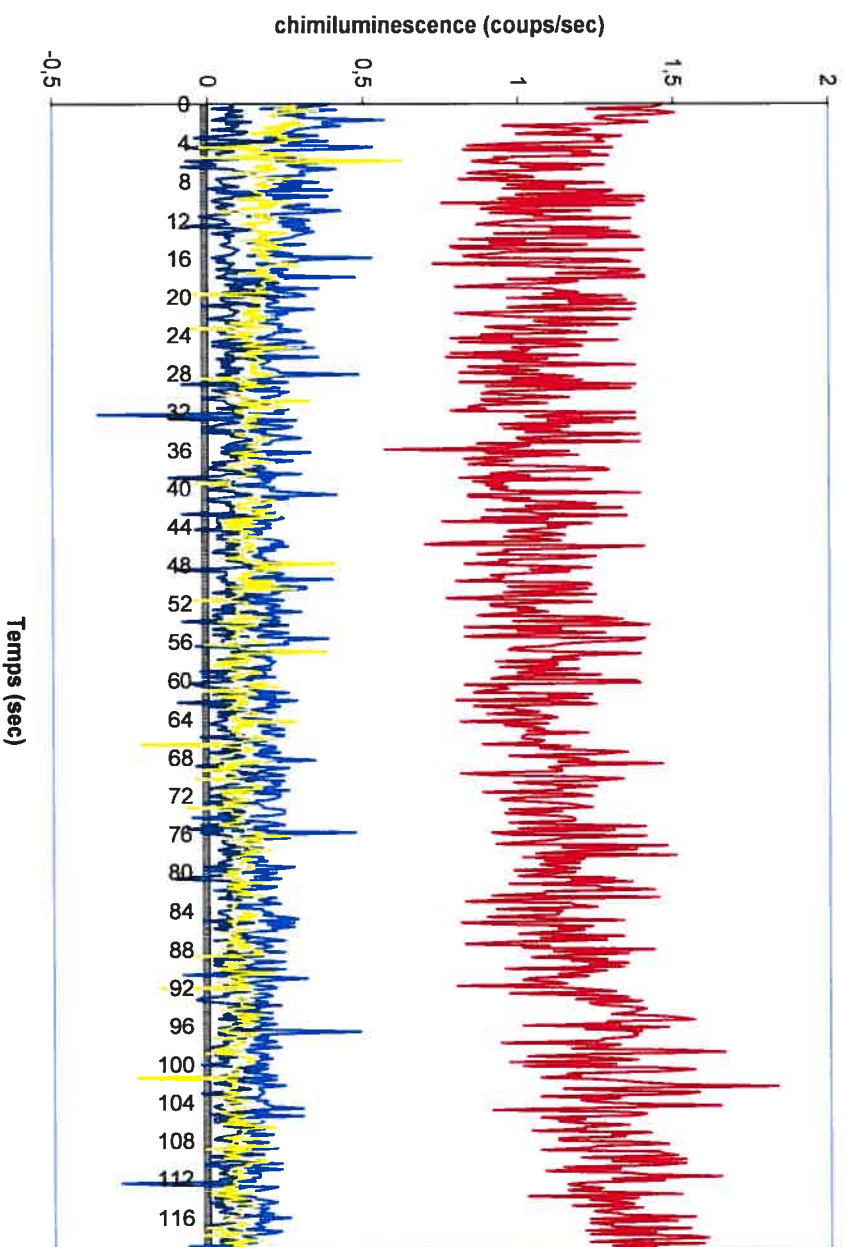
## Sujet 3N



- Cellules seules (0.052)
- Cellules avec luminol (892.867)
- Cellules avec luminol et MKF (706.370)
- Cellules avec luminol, MKF et NADPH (217.798)



## Sujet 4N

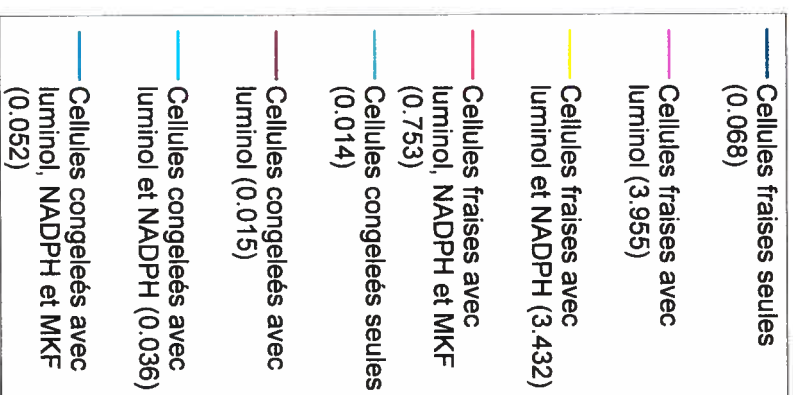
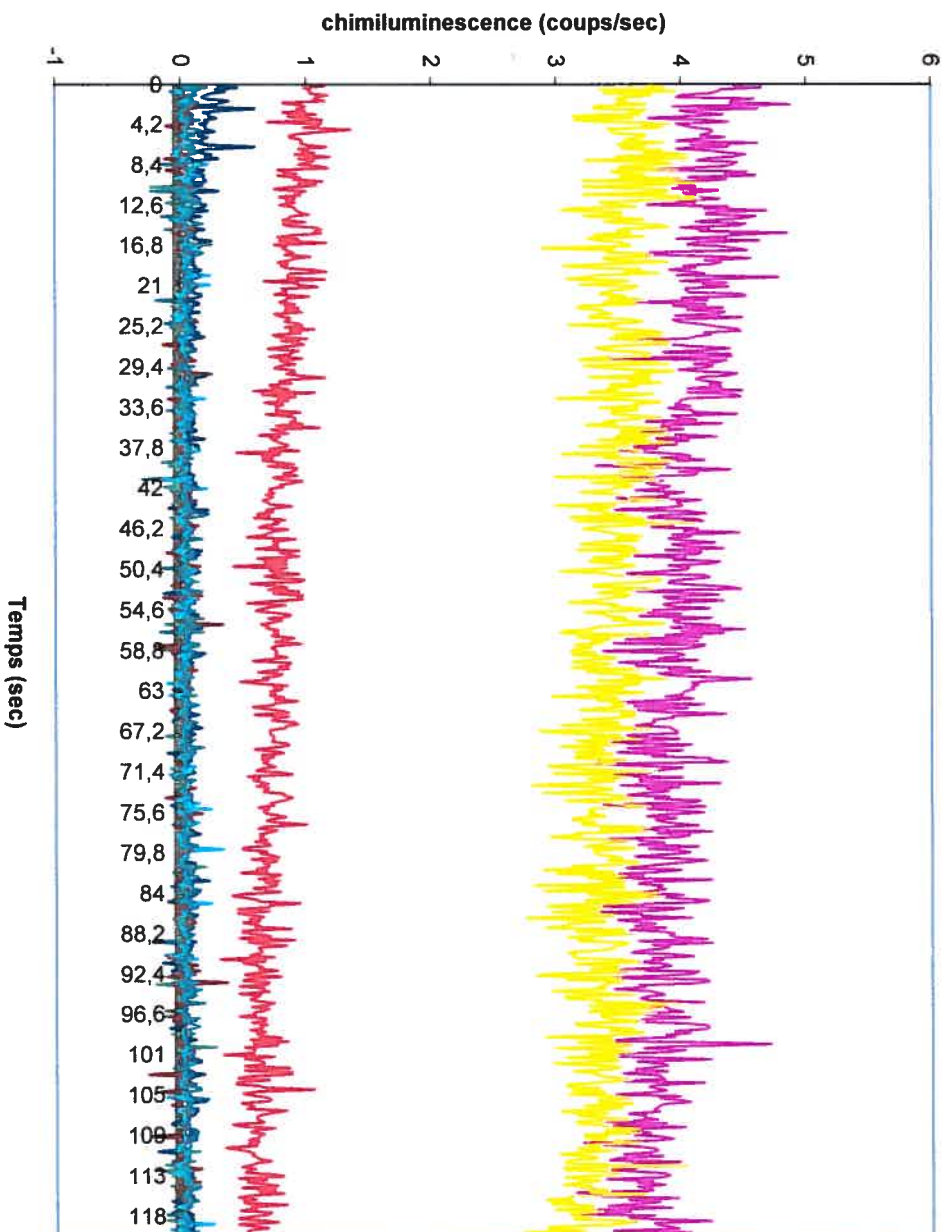


- Cellules seules (0.062)
- Cellules avec luminol (0.188)
- Cellules avec luminol et MKF (0.123)
- Cellules avec luminol, MKF et NADPH (1.141)

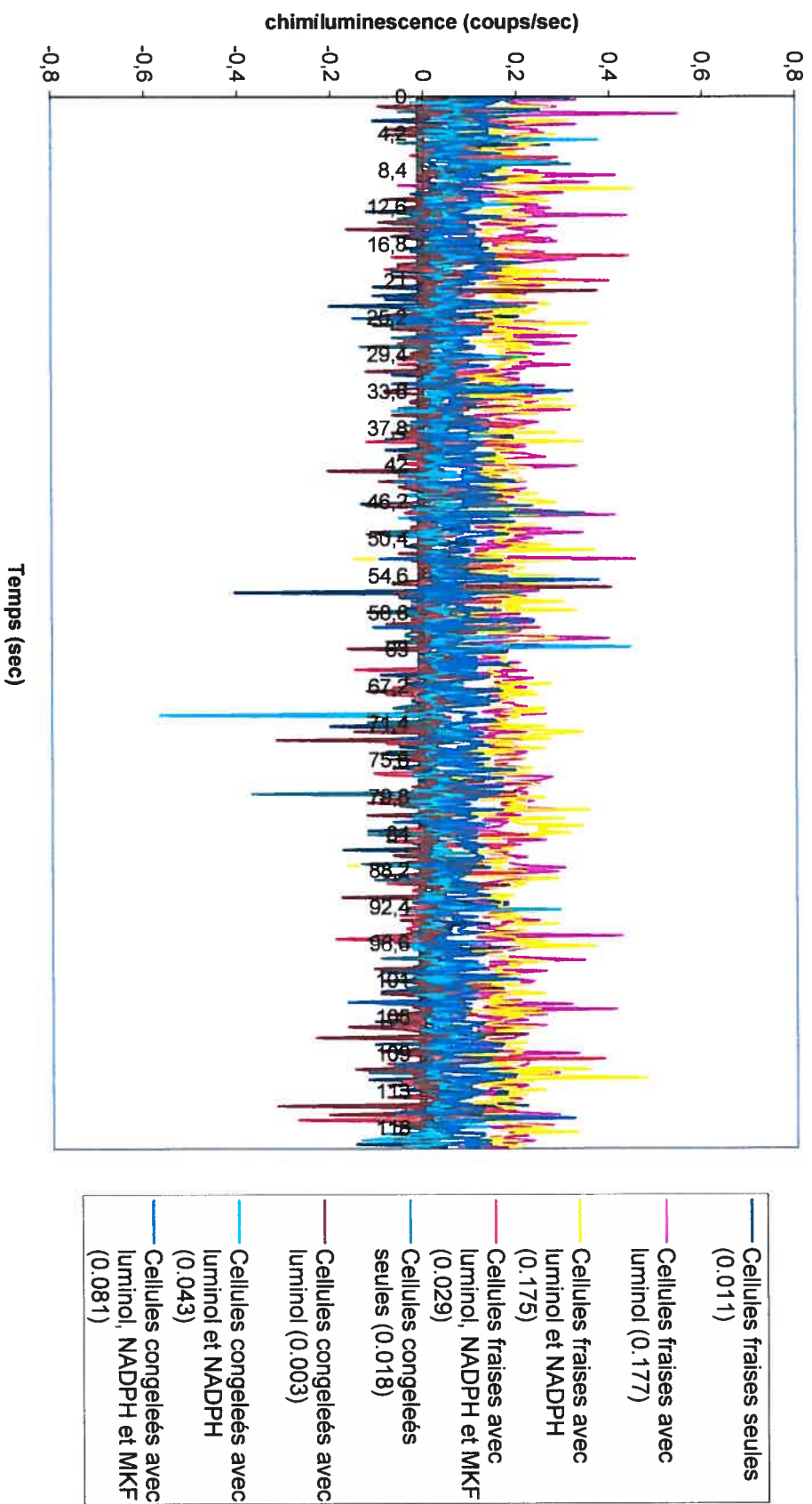
**ANNEXE 3 :**

*Tracés des mesures de la chimiluminescence des cellules du sperme, frais et congelé,  
de fumeurs et des non fumeurs, en fonction du temps ; effet du NADPH et du MKF*

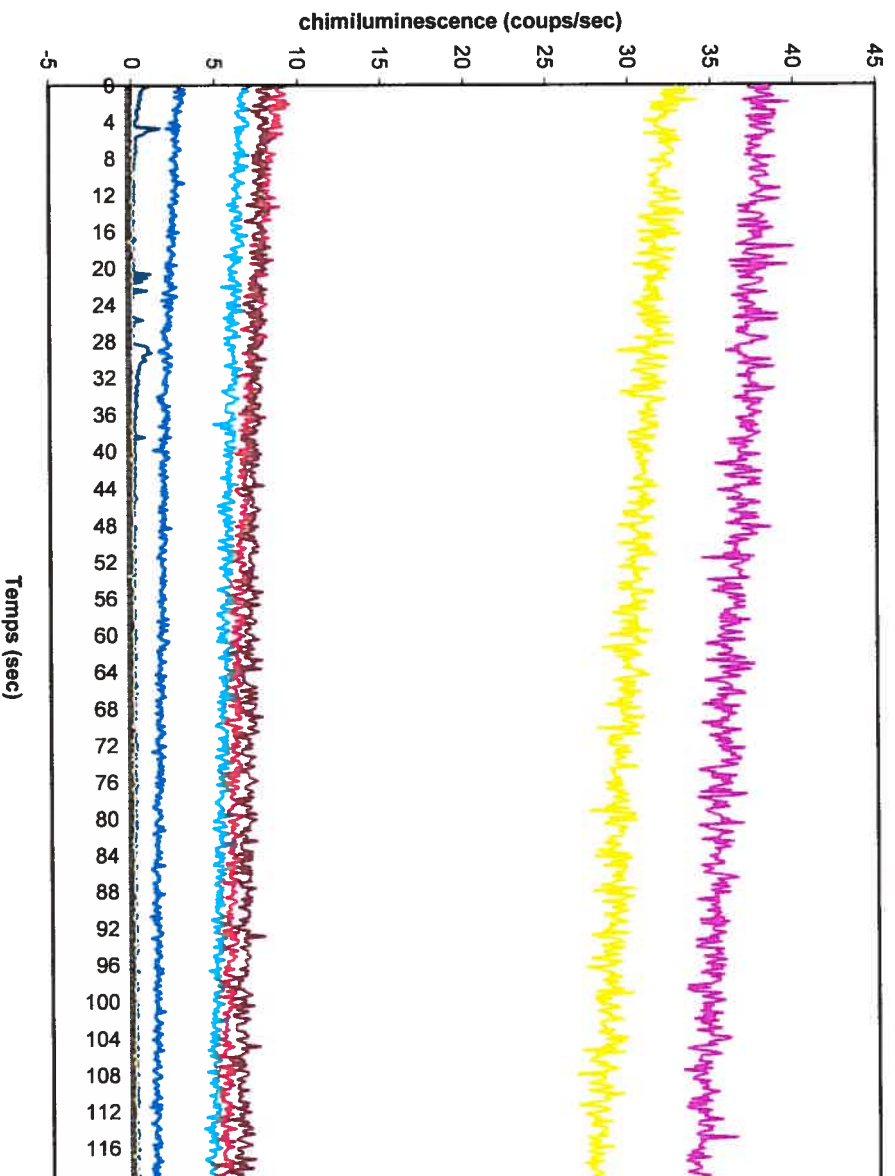
## Sujet NF25



## Sujet NF26

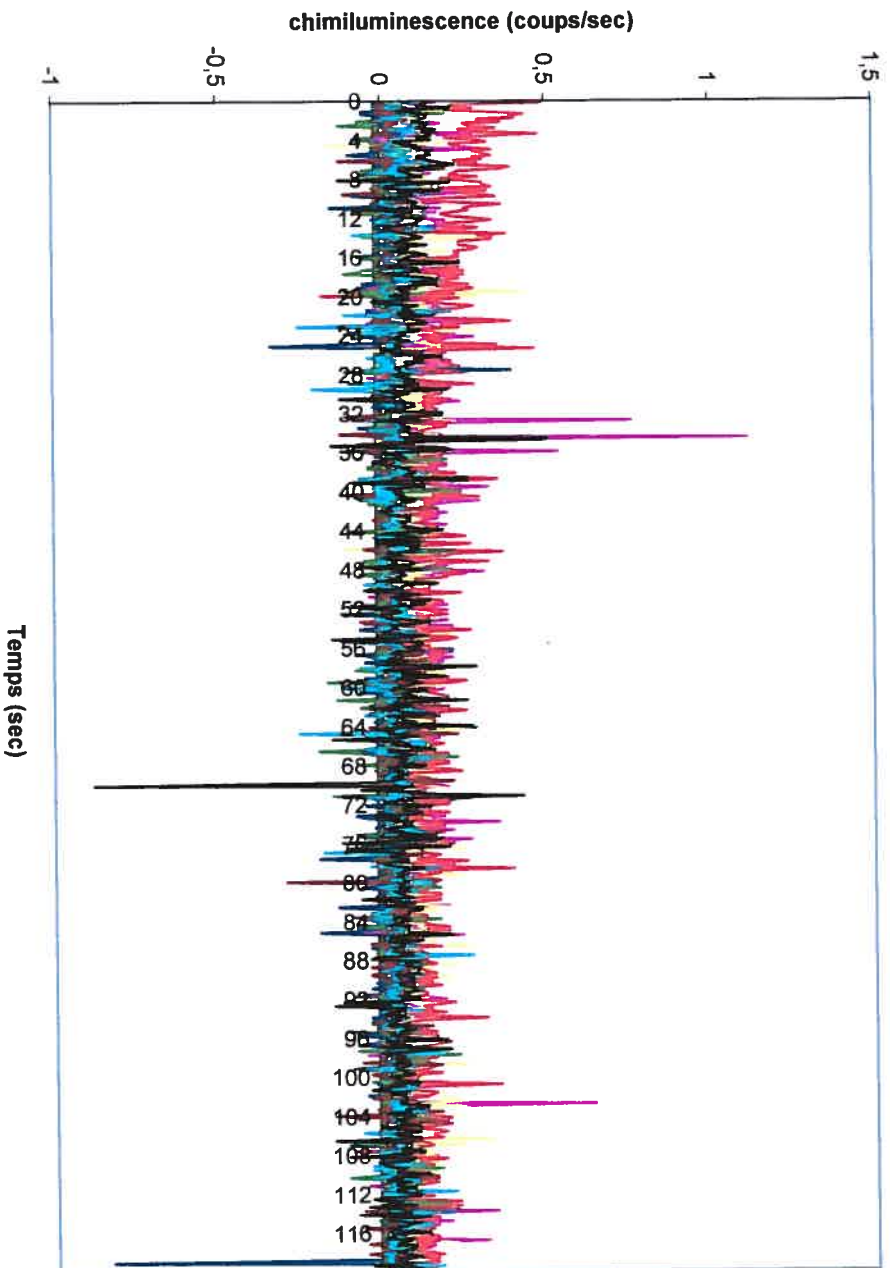


## Sujet F02



- Cellules fraiches seules  
(0.108)
- Cellules fraiches avec luminol  
(36.141)
- Cellules fraiches avec luminol  
et NADPH (30.153)
- Cellules fraises avec  
luminol, NADPH et MKF  
(6.522)
- Cellules congelees seules  
(0.023)
- Cellules congelees avec  
luminol (7.020)
- Cellules congelees avec  
luminol et NADPH (5.504)
- Cellules congelees avec  
luminol, NADPH et MKF  
(1.744)

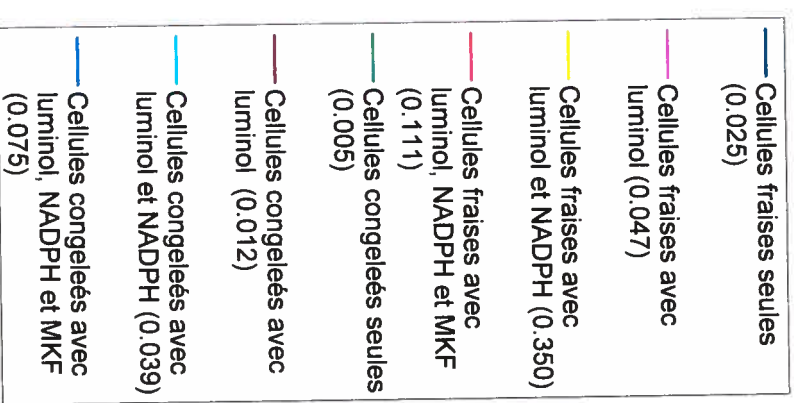
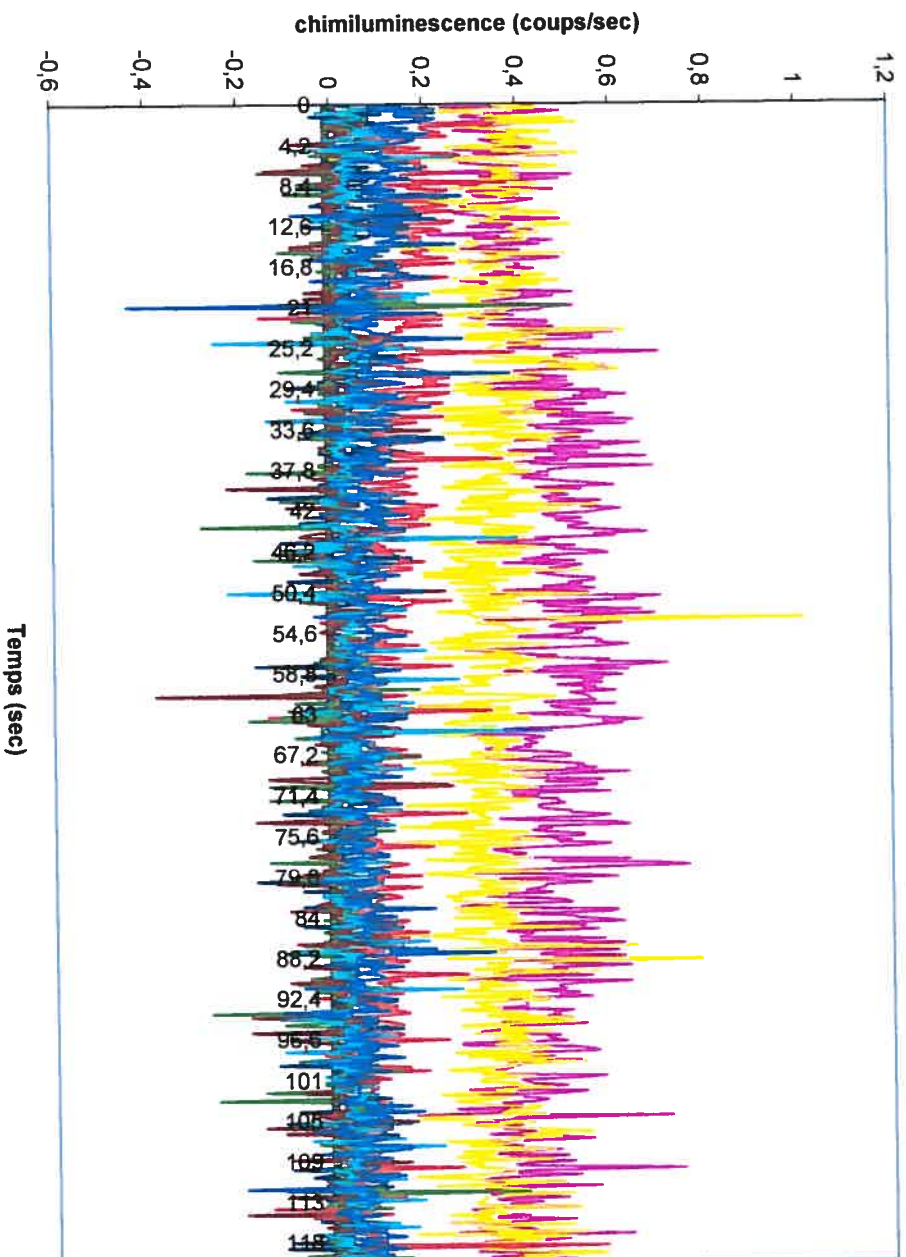
## Sujet F05



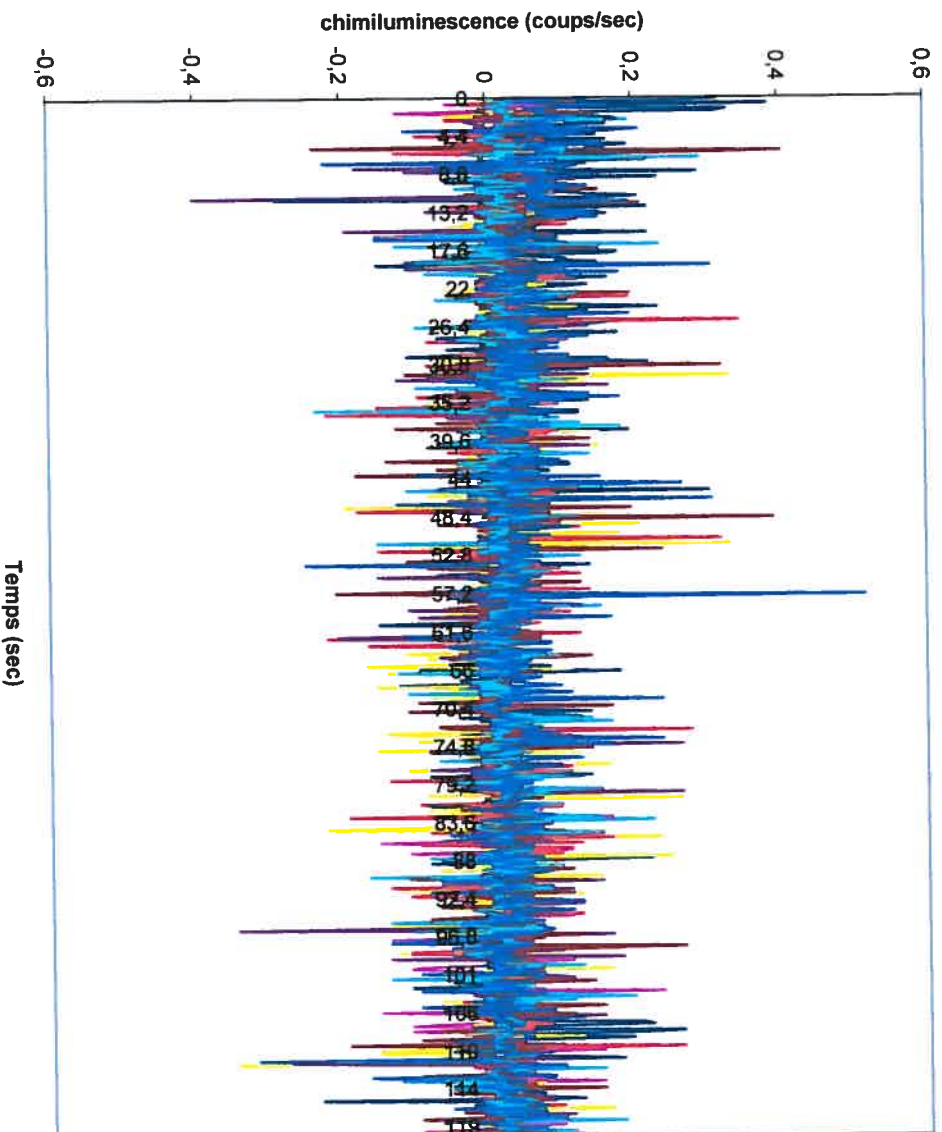
- Cellules fraîches seules (0.009)
- Cellules fraîches avec luminol (0.107)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (0.108)
- Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (0.155)
- Cellules congelées seules (0.017)
- Cellules congelées avec luminol (0.027)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0.039)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0.063)



## Sujet F06



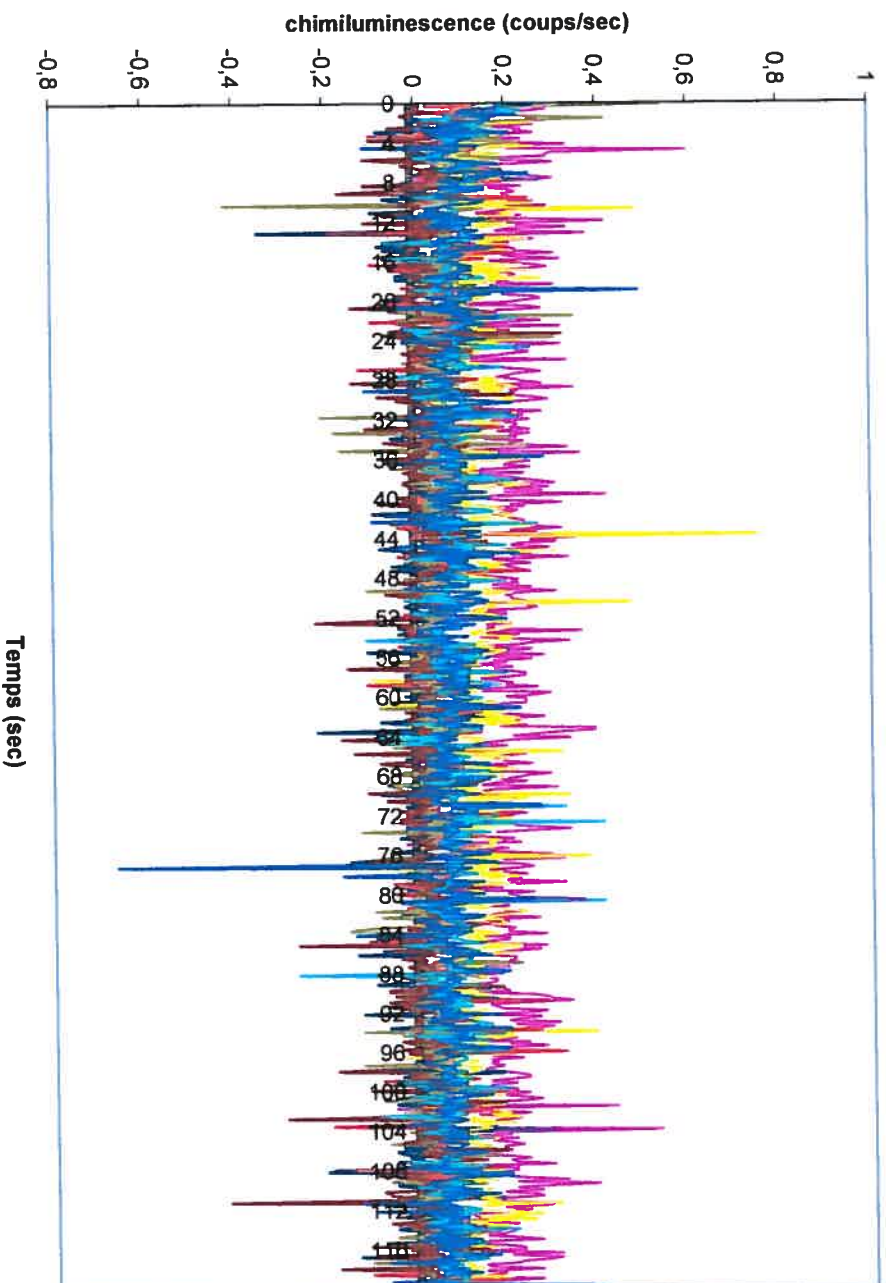
## Sujet F11



- Cellules fraises seules (0.034)
- Cellules fraises avec luminol (0.002)
- Cellules fraises avec luminol et NADPH (0.004)
- Cellules fraises avec luminol, NADPH et MKF (0.023)
- SN/LP (0.012)
- Cellules congelés seules (0.028)
- Cellules congelés avec luminol (0.020)
- Cellules congelés avec luminol et NADPH (0.037)

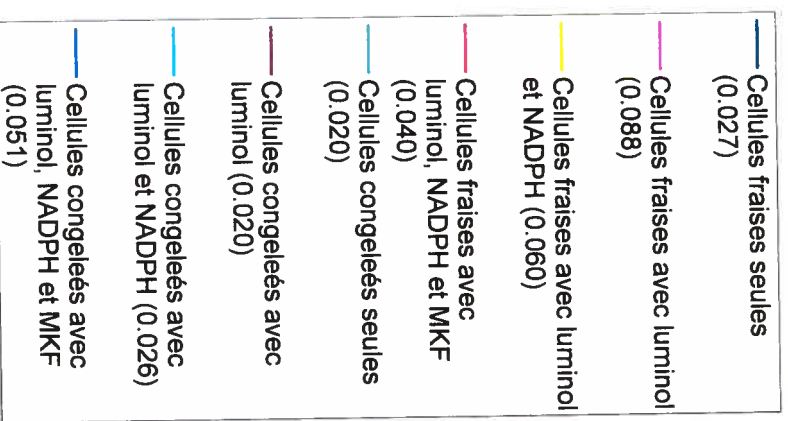
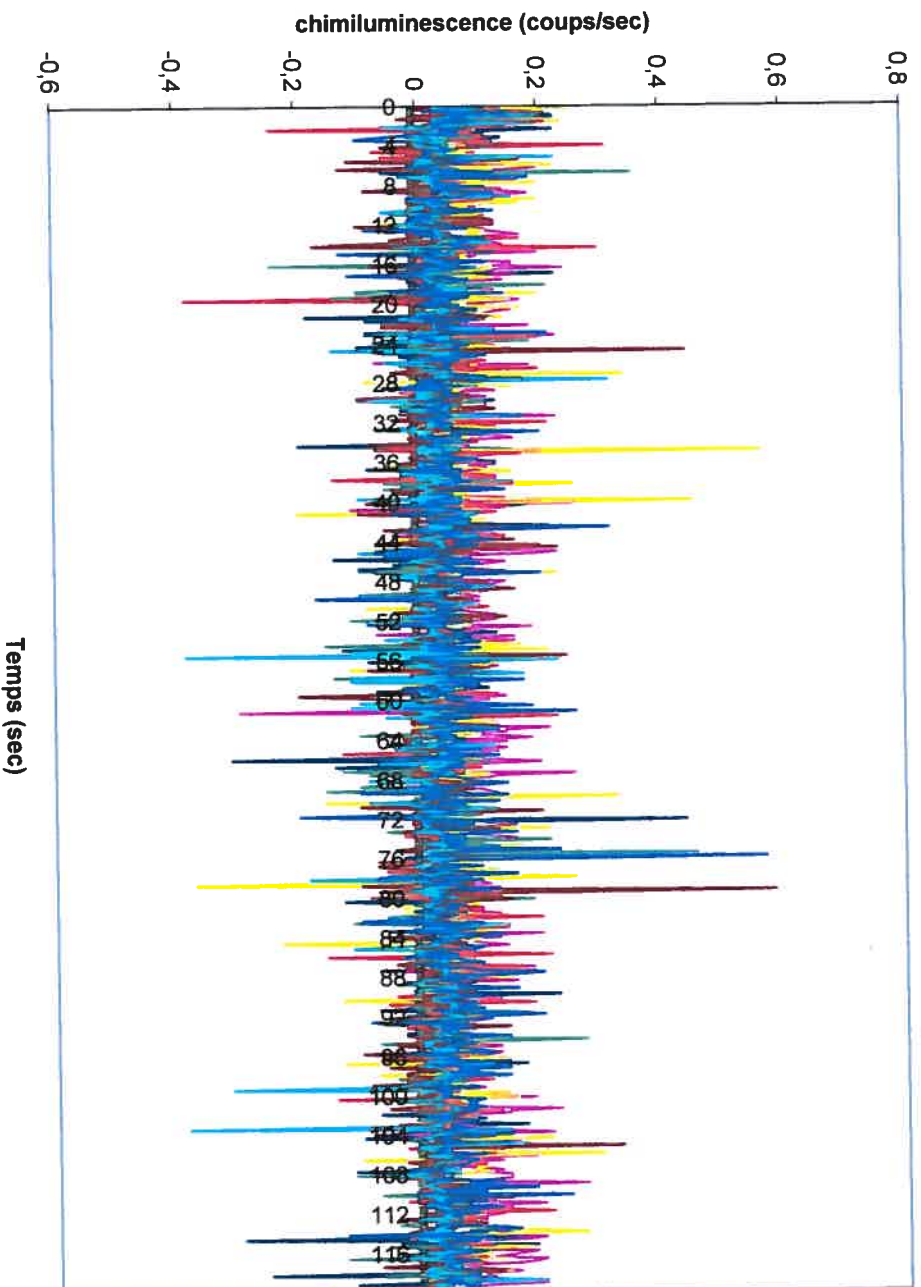


## Sujet F15

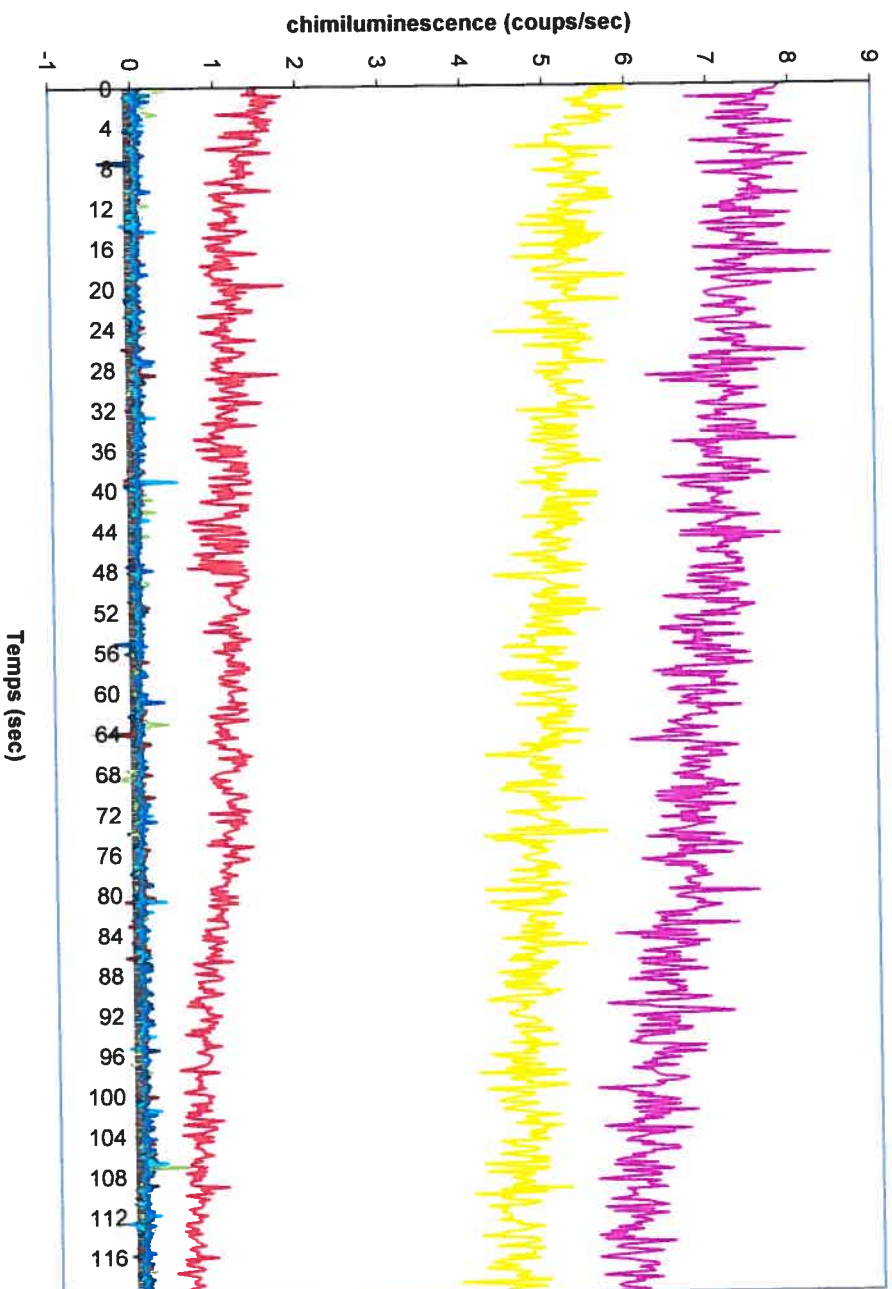


- Cellules fraises seules (0.011)
- Cellules fraises avec luminol (0.201)
- Cellules fraises avec luminol et NADPH (0.129)
- Cellules fraises avec luminol, NADPH et MKF (0.046)
- Cellules congelées seules (0.036)
- Cellules congelées avec luminol (0.005)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0.078)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0.073)

## Sujet F17

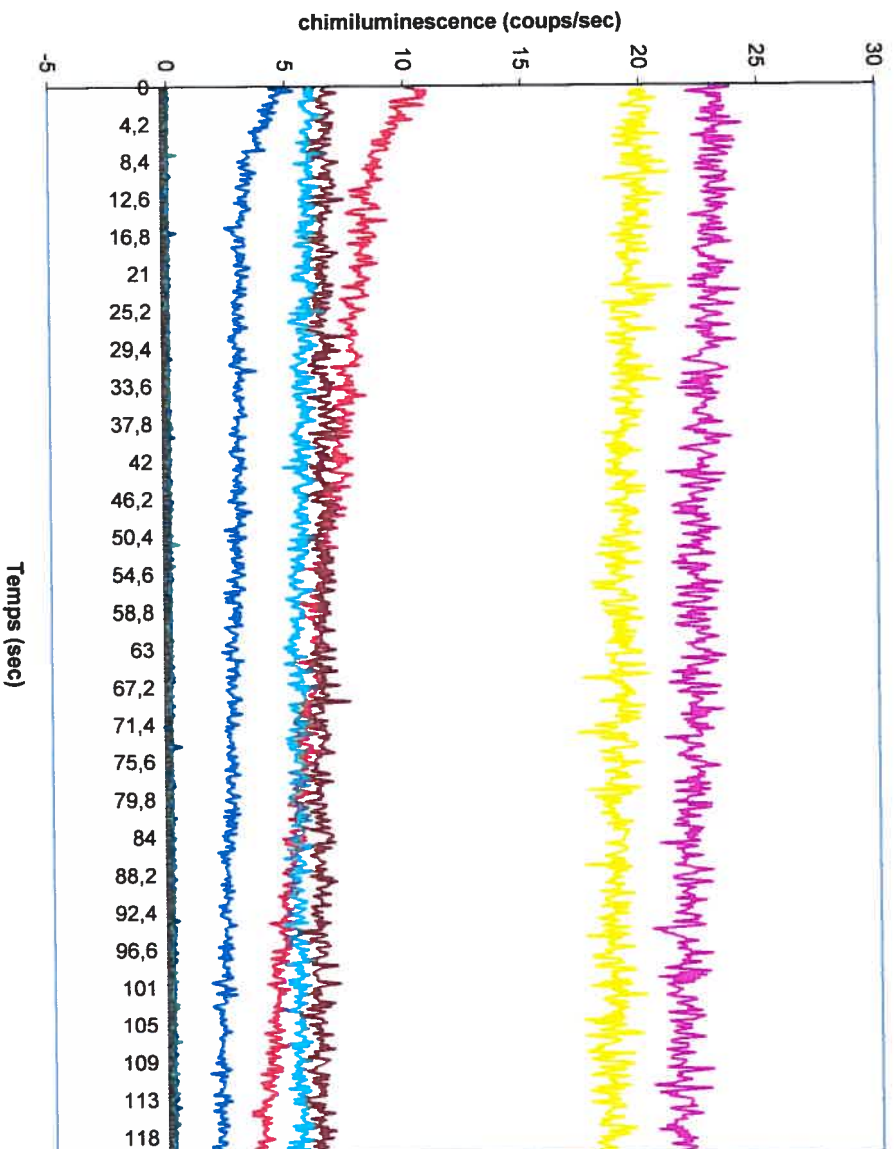


## Sujet F23



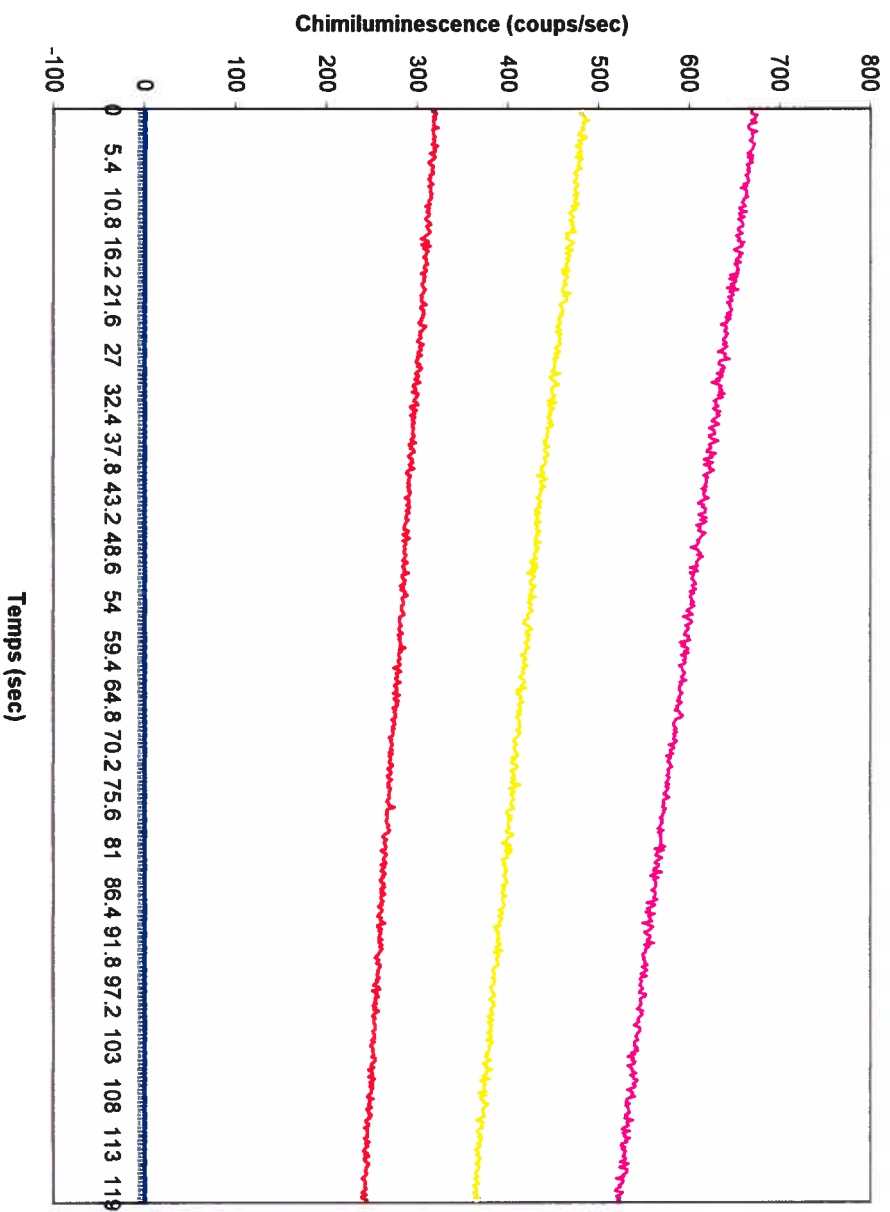
- Cellules fraiches seules (0.022)
- Cellules fraiches avec luminol (6.823)
- Cellules fraiches avec luminol et NADPH (4.982)
- Cellules fraiches avec luminol, NADPH et MKF (1.023)
- Cellules congelées seules (0.040)
- Cellules congelées avec luminol (0.021)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0.029)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0.042)

## Sujet F24



- Cellules fraises seules (0.005)
- Cellules fraises avec luminol (22.293)
- Cellules fraises avec luminol et NADPH (19.157)
- Cellules fraises avec luminol, NADPH et MKF (6.363)
- Cellules congelées seules (0.013)
- Cellules congelées avec luminol (6.380)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (5.514)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (2.700)

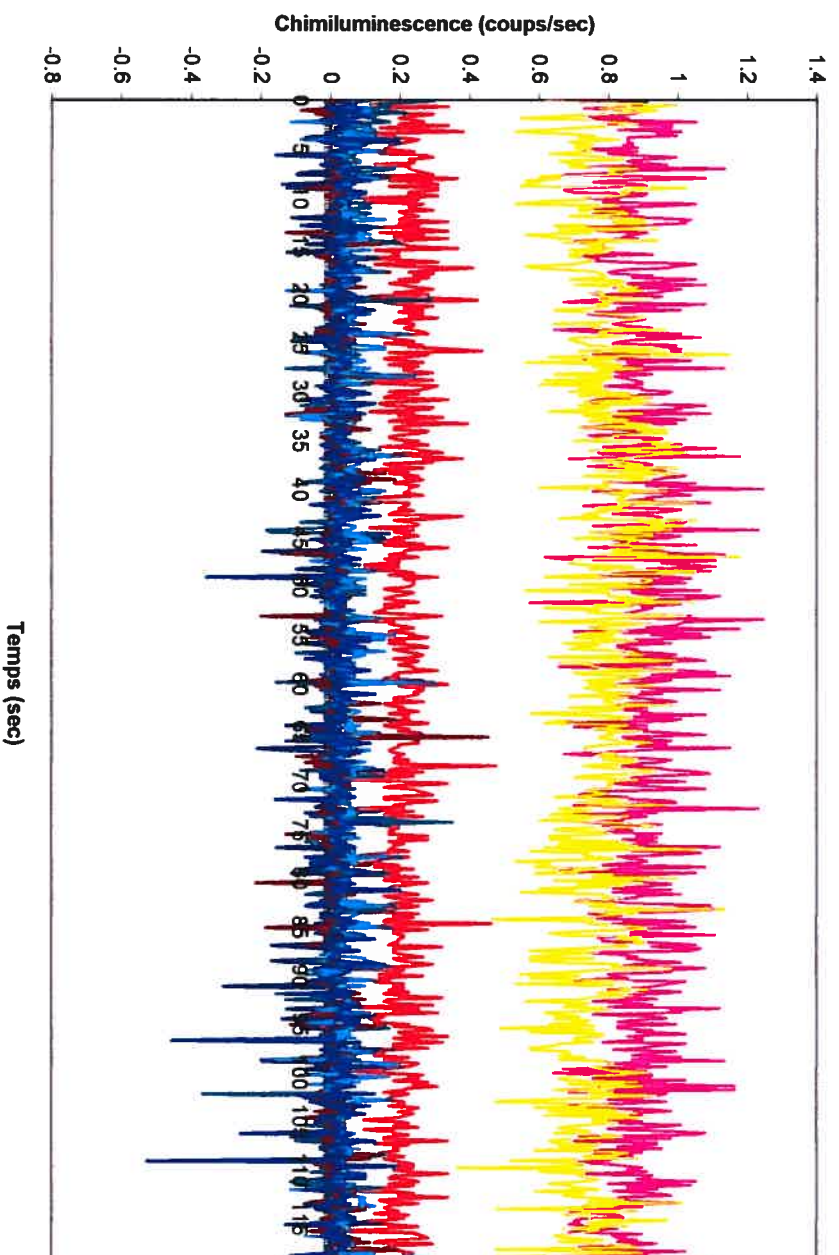
## Sujet P01



- Cellules fraîches seules (0,032)
- Cellules fraîches avec luminol (595,153)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (420,464)
- Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (279,335)
- Cellules congelées seules (0,000)
- Cellules congelées avec luminol (0,040)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,887)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,122)

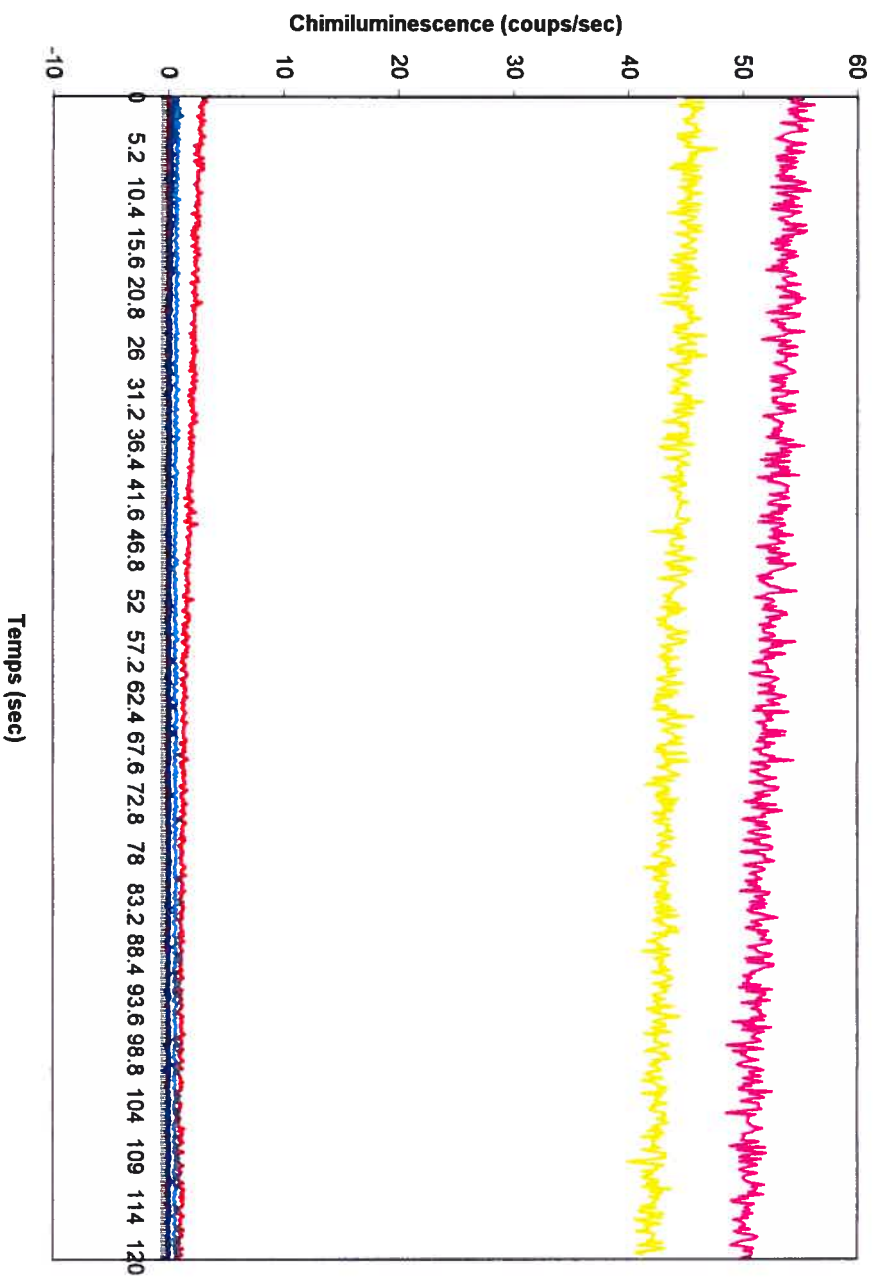


## Sujet P02



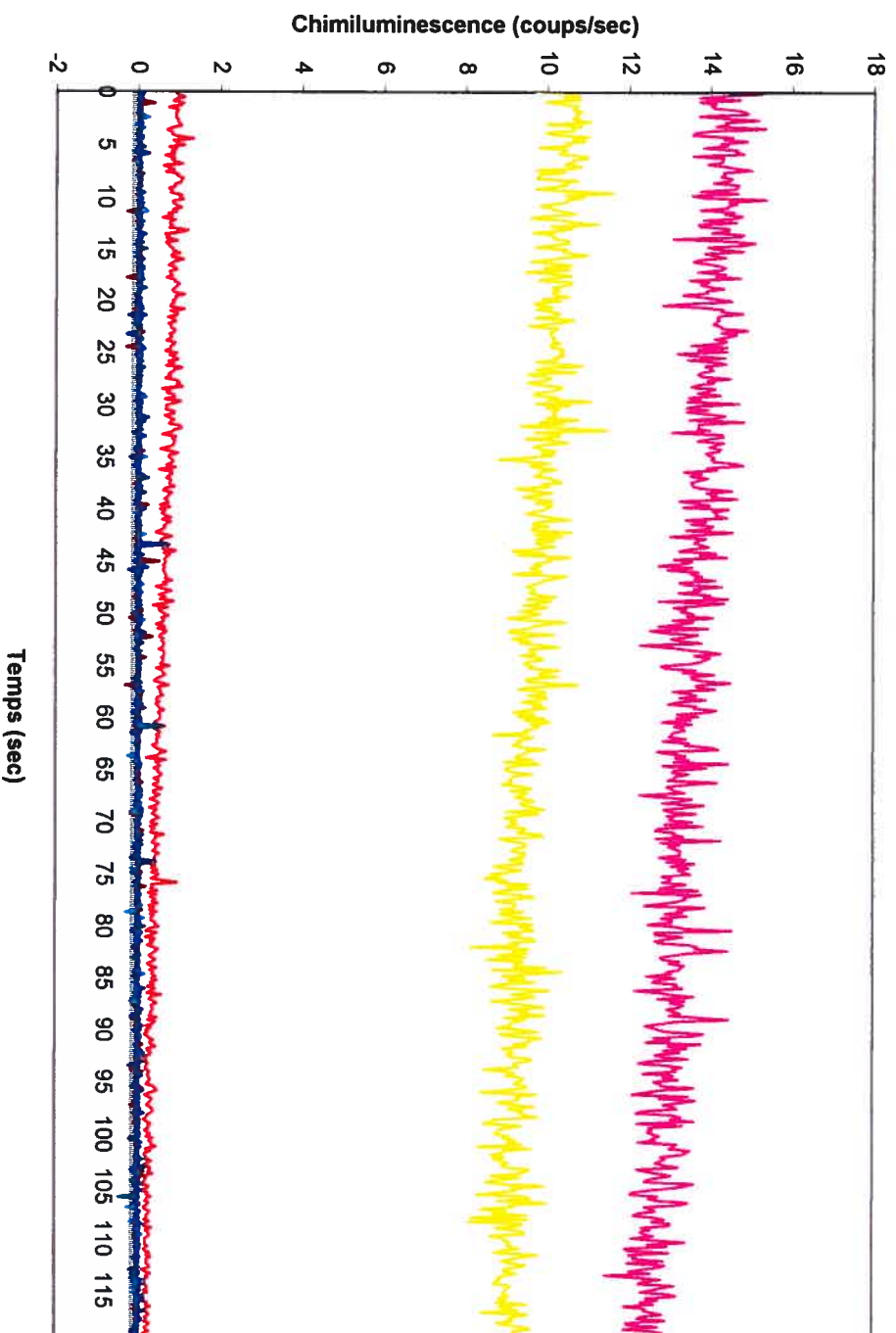
- Cellules fraîches seules (0,008)
- Cellules fraîches avec luminol (0,891)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (0,770)
- Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (0,210)
- Cellules congelées seules (0,018)
- Cellules congelées avec luminol (0,012)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,049)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,023)

## Sujet P03



- Cellules fraîches seules (0,007)
- Cellules fraîches avec luminol (52,22)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (43,69)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (1,626)
- Cellules congelées seules (0,067)
- Cellules congelées avec luminol (0,009)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,669)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,130)

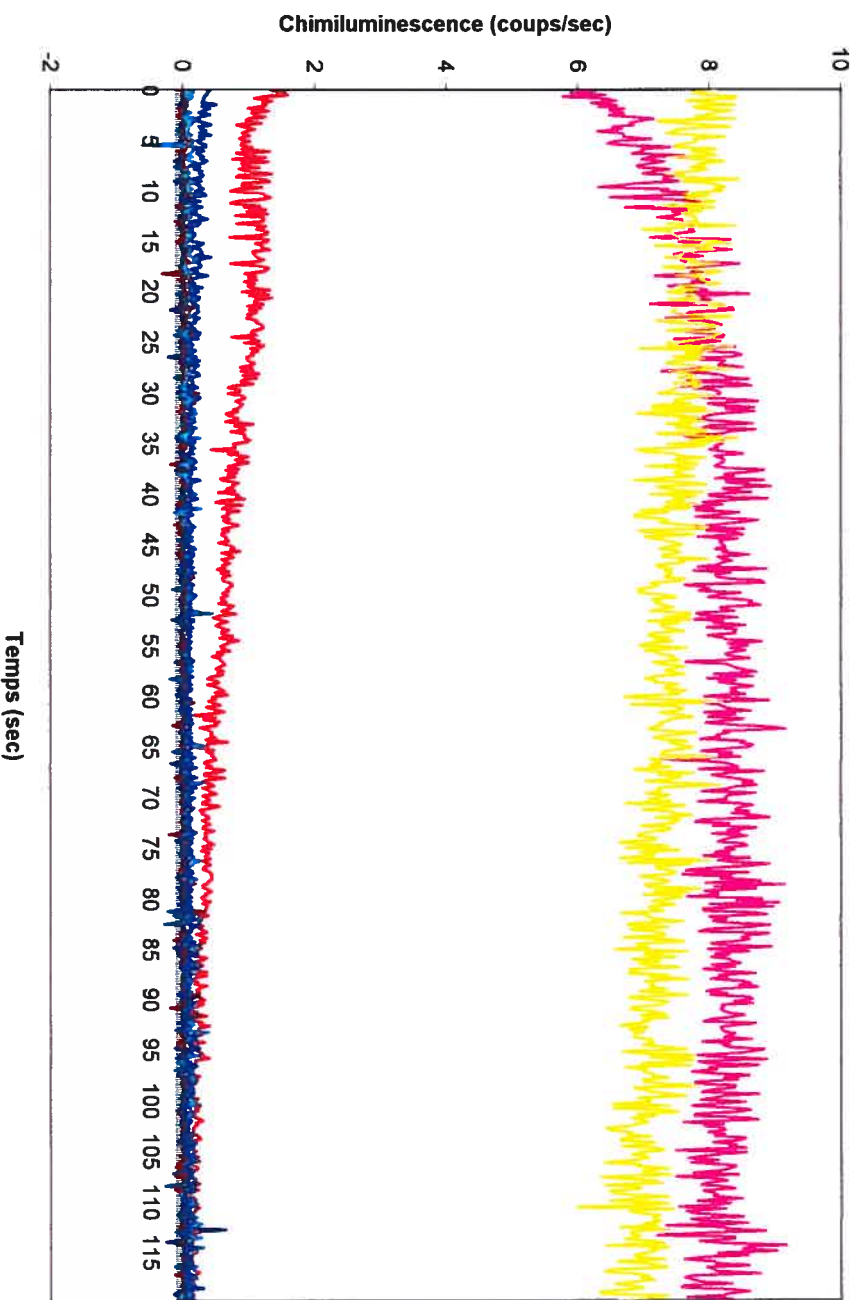
## Sujet P04



- Cellules fraîches seules (0,011)
- Cellules fraîches avec luminol (13,44)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (9,629)
- Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (0,554)
- Cellules congelées seules (0,015)
- Cellules congelées avec luminol (0,008)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,025)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,017)

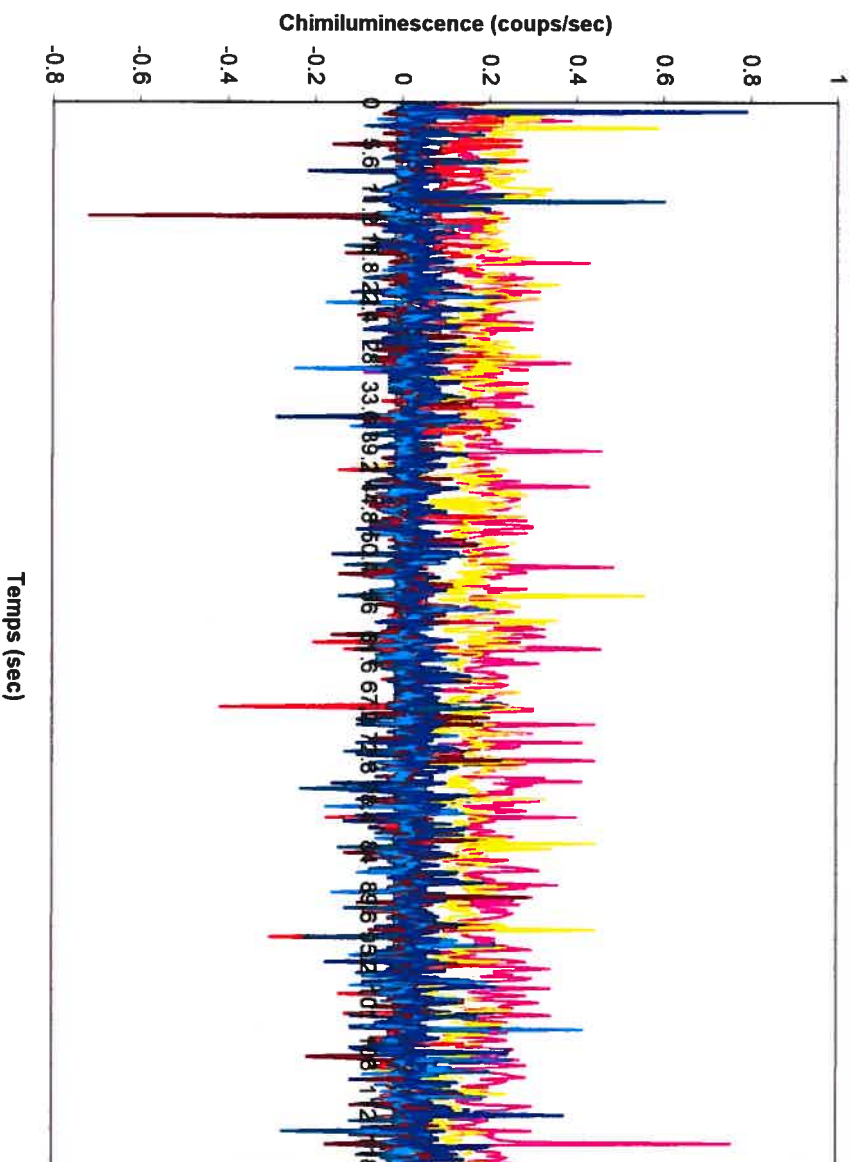


## Sujet P05



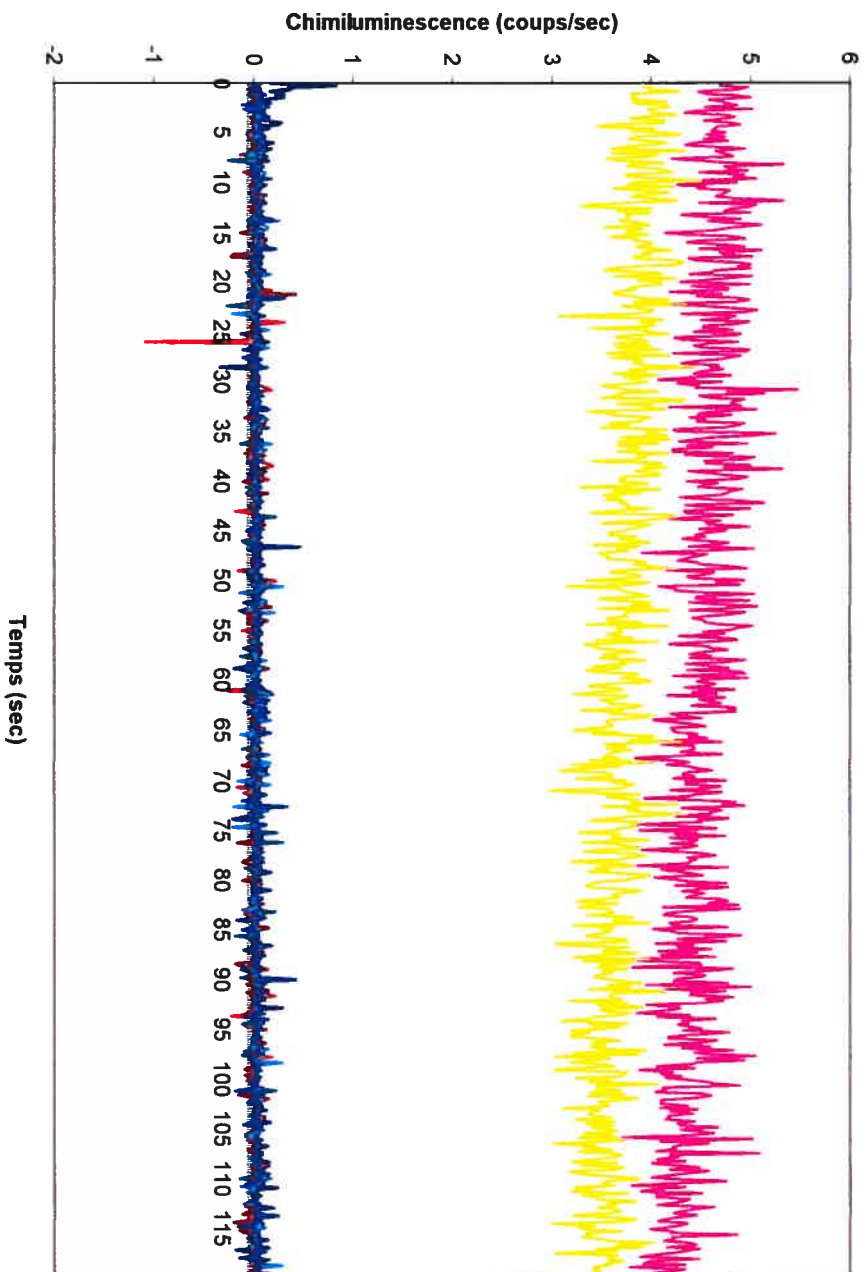
- Cellules fraîches seules (0,013)
- Cellules fraîches avec luminol (8,047)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (7,352)
- Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (0,576)
- Cellules congelées seules (0,010)
- Cellules congelées avec luminol (0,028)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,105)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,124)

## Sujet P06



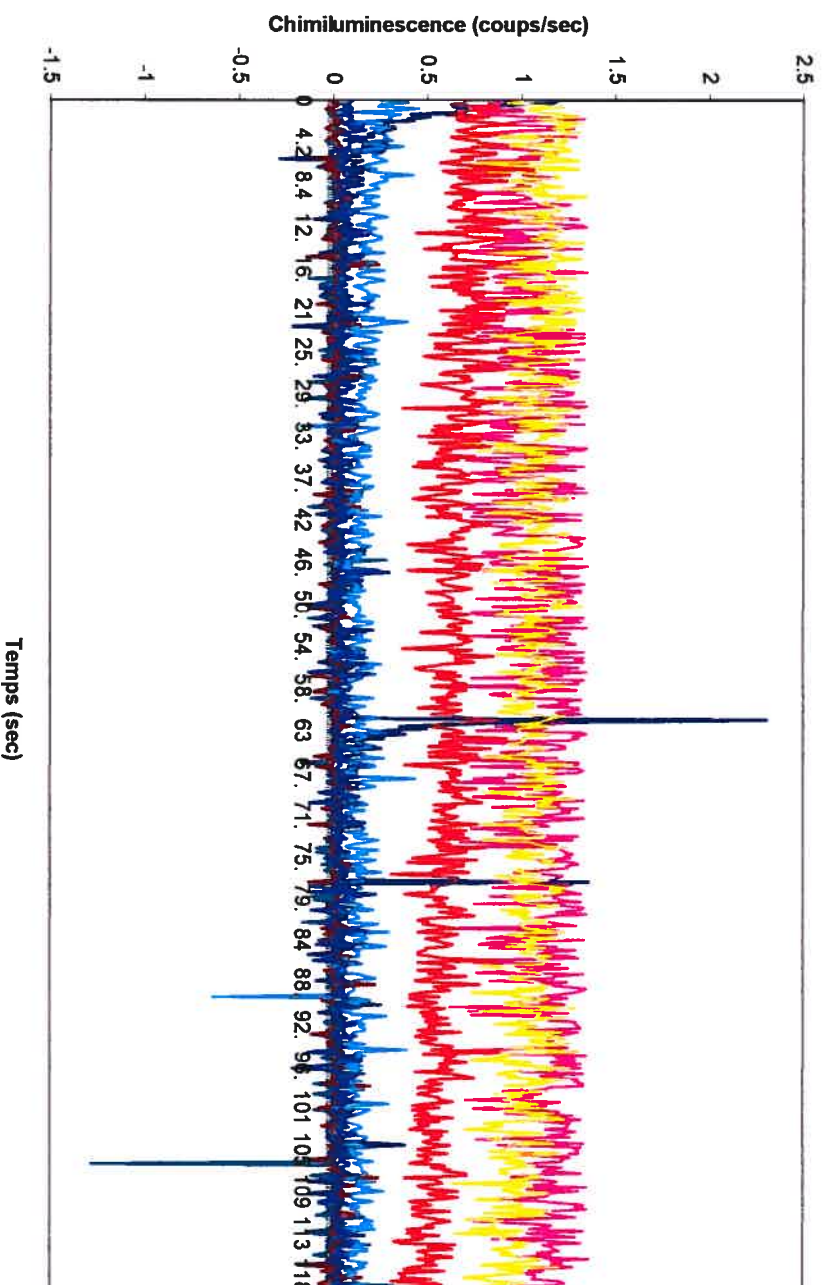
- Cellules fraîches seules (0,015)
- Cellules fraîches avec luminol (0,198)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (0,161)
- Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (0,032)
- Cellules congelées seules (0,005)
- Cellules congelées avec luminol (0,015)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,019)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,42)

## Sujet P07



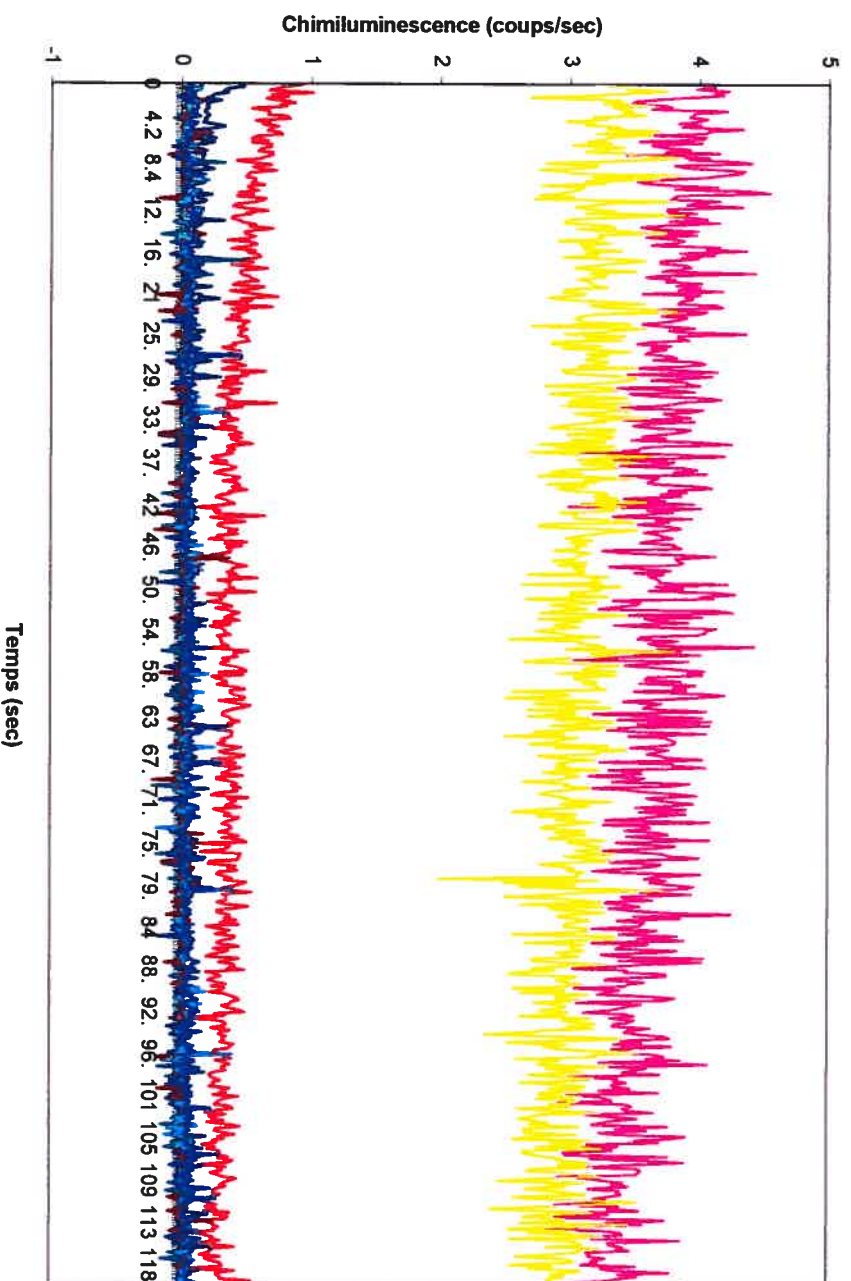
- Cellules fraîches seules (0,029)
- Cellules fraîches avec luminol (4,503)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (3,696)
- Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (0,024)
- Cellules congelées seules (0,011)
- Cellules congelées avec luminol (0,003)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,040)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,035)

## Sujet P08



- Cellules fraîches seules (0,064)
- Cellules fraîches avec luminol (1,077)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (1,048)
- Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (0,616)
- Cellules congelées seules (0,008)
- Cellules congelées avec luminol (0,014)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,144)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,042)

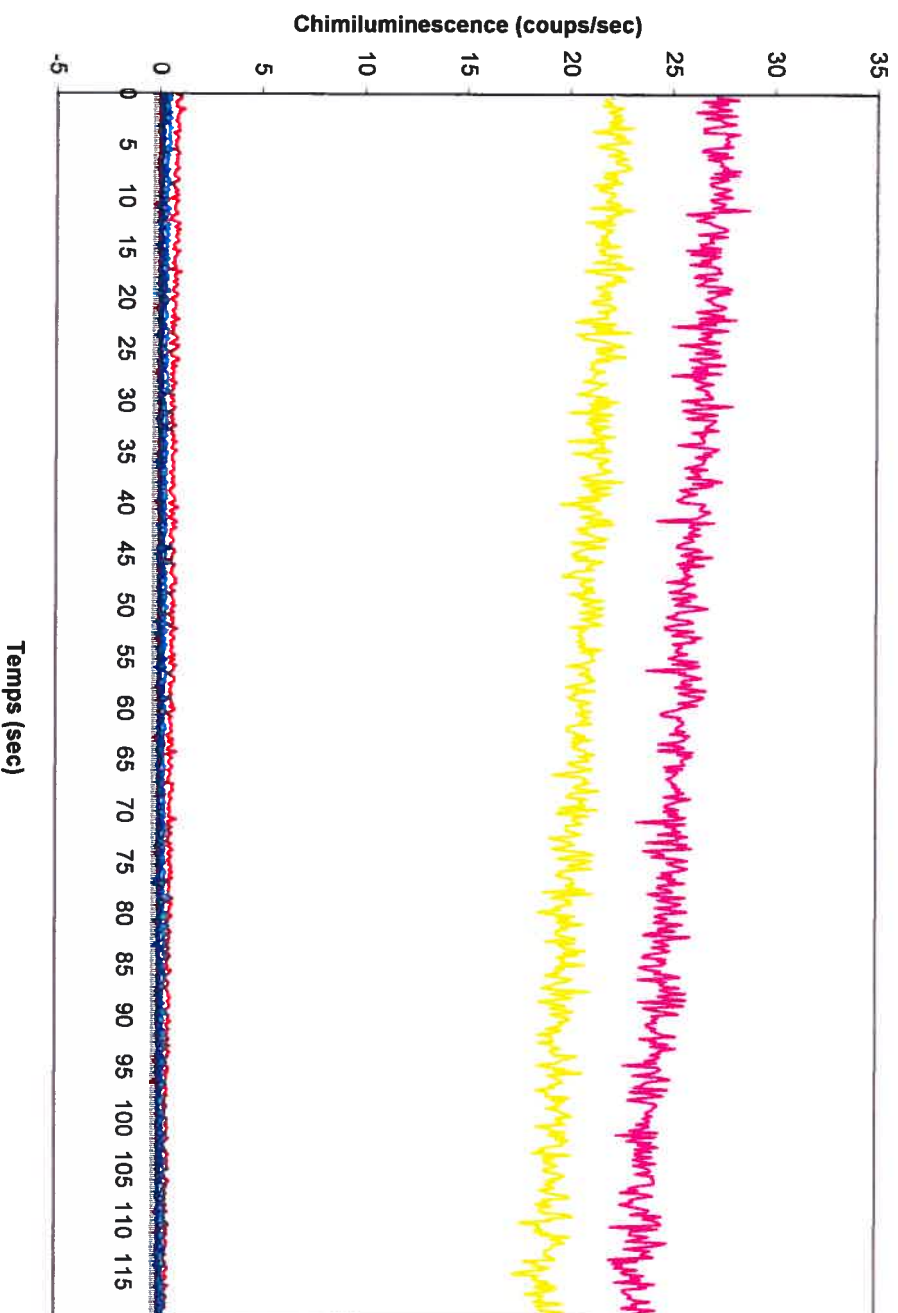
## Sujet P09



- Cellules fraîches seules (0,059)
- Cellules fraîches avec luminol (3,656)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (3,060)
- Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (0,398)
- Cellules congelées seules (0,014)
- Cellules congelées avec luminol (0,029)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,059)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,064)

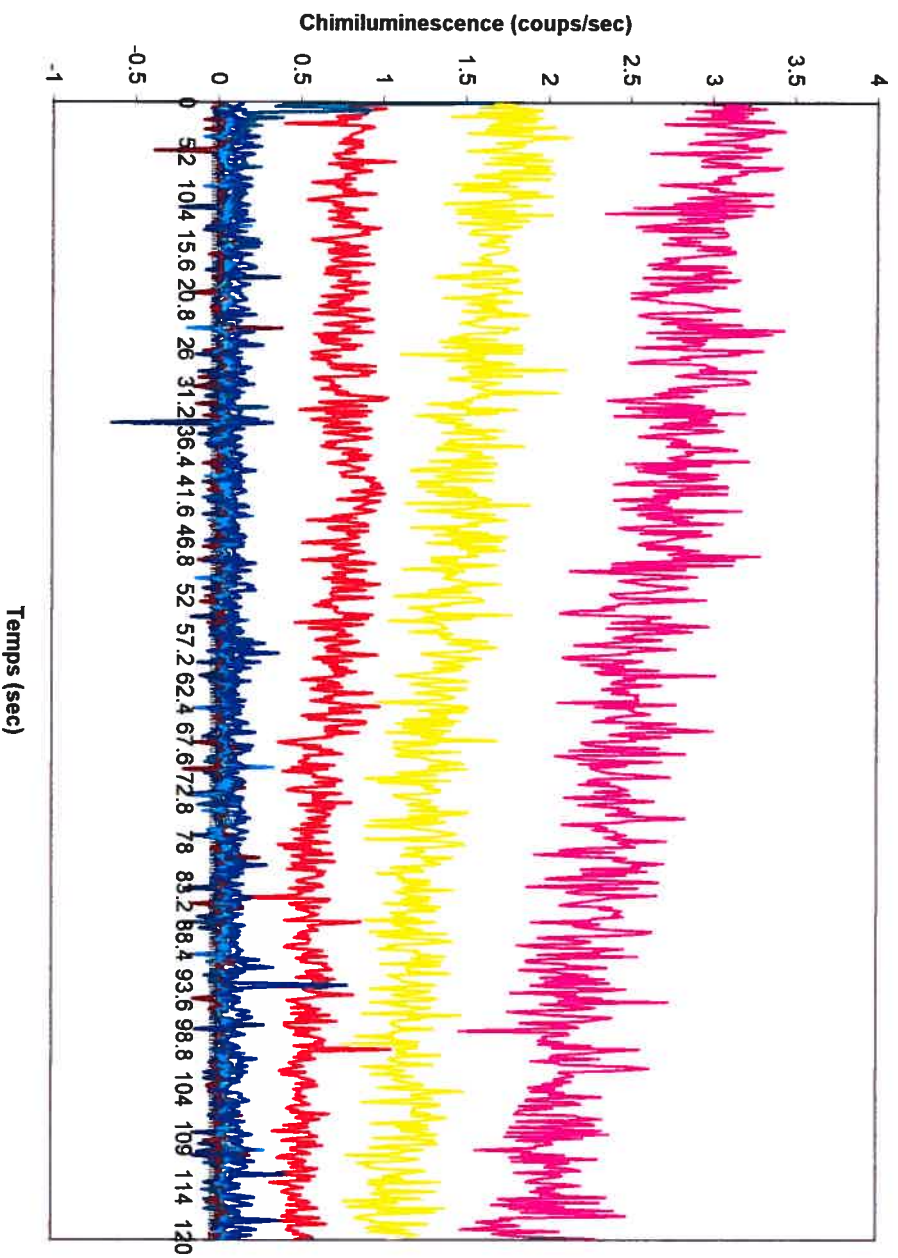


## Sujet P10



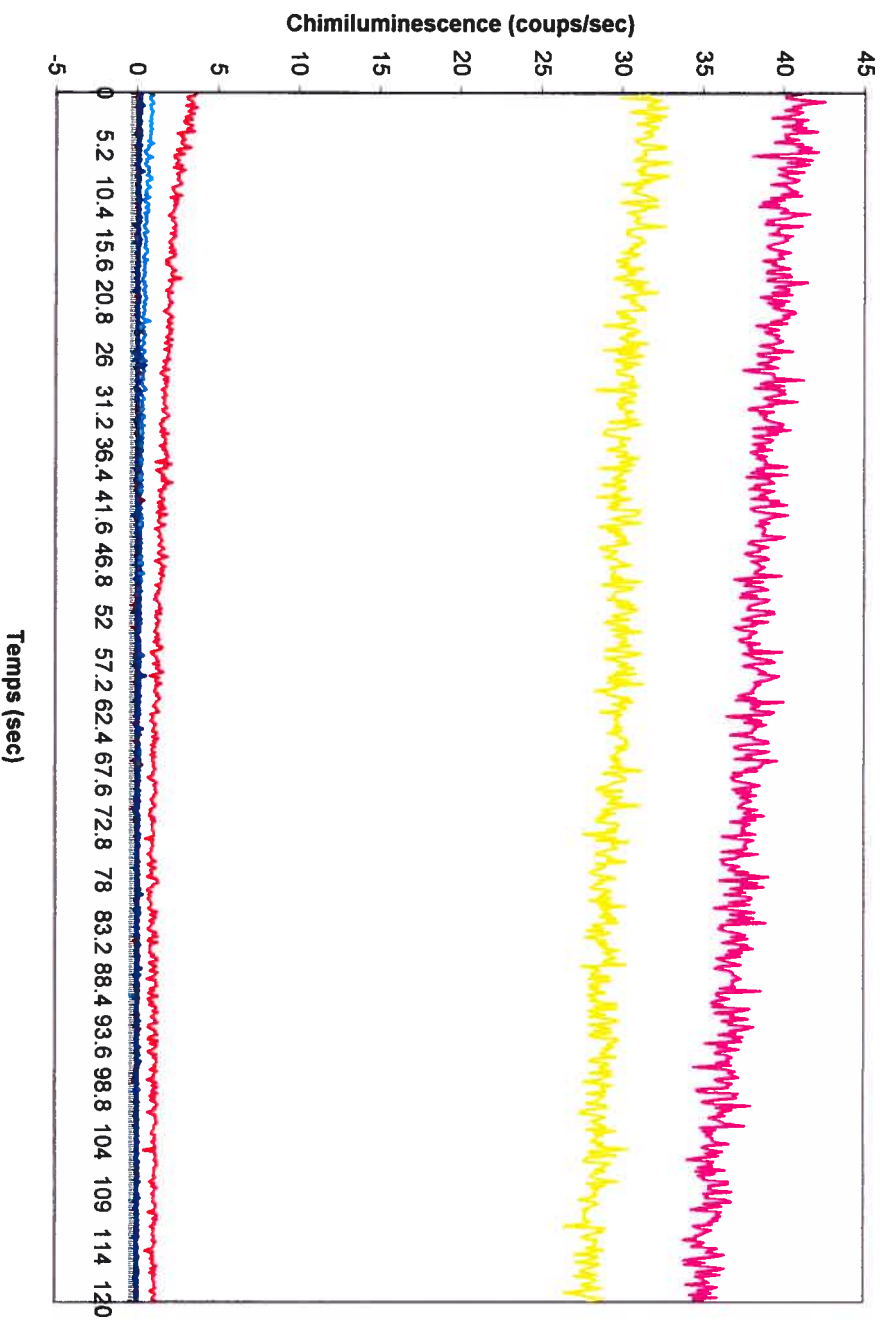
- Cellules fraîches seules (0,046)
- Cellules fraîches avec luminol (25,36)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (20,50)
- Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (0,594)
- Cellules congelées seules (0,032)
- Cellules congelées avec luminol (0,023)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,290)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,093)

## Sujet P11



- Cellules fraîches seules  
(0,014)
- Cellules fraîches avec luminol  
(2,518)
- Cellules fraîches avec luminol  
et NADPH (1,377)
- Cellules fraîches avec  
luminol, NADPH et MKF  
(0,668)
- Cellules congelées seules  
(0,055)
- Cellules congelées avec  
luminol (0,023)
- Cellules congelées avec  
luminol et NADPH (0,056)
- Cellules congelées avec  
luminol, NADPH et MKF  
(0,116)

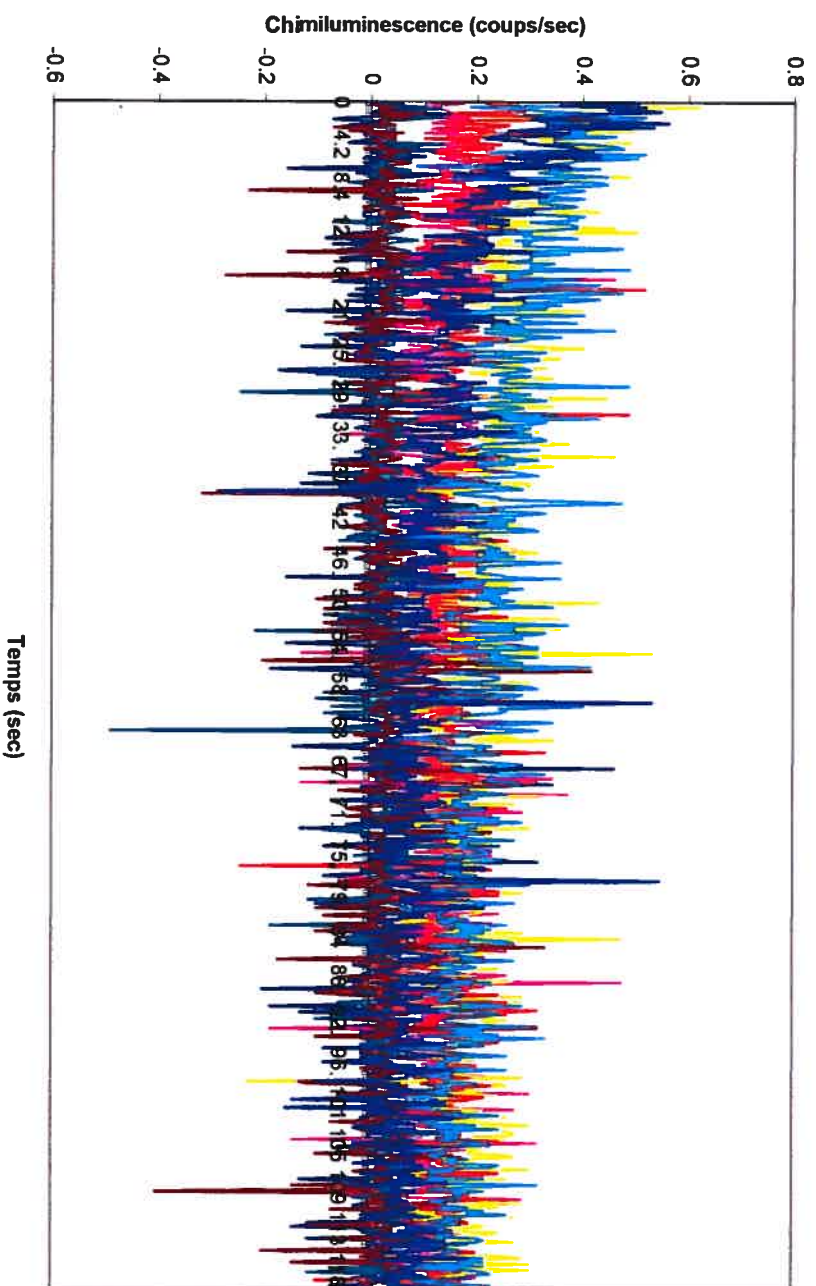
## Sujet P12



- Cellules fraîches seules (0,015)
- Cellules fraîches avec luminol (37,89)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (29,59)
- Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (1,475)
- Cellules congelées seules (0,013)
- Cellules congelées avec luminol (0,026)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,245)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,054)

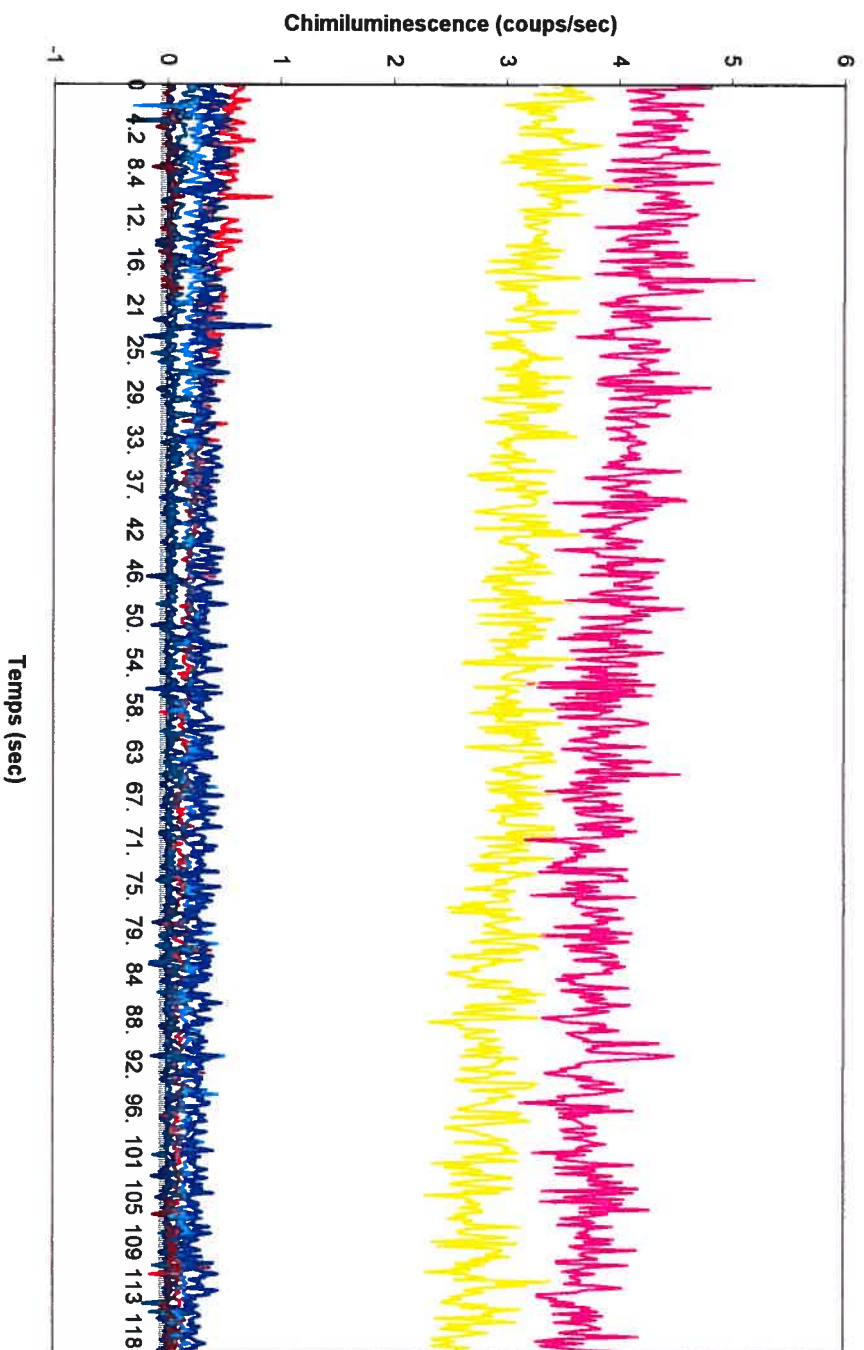


## Sujet P13



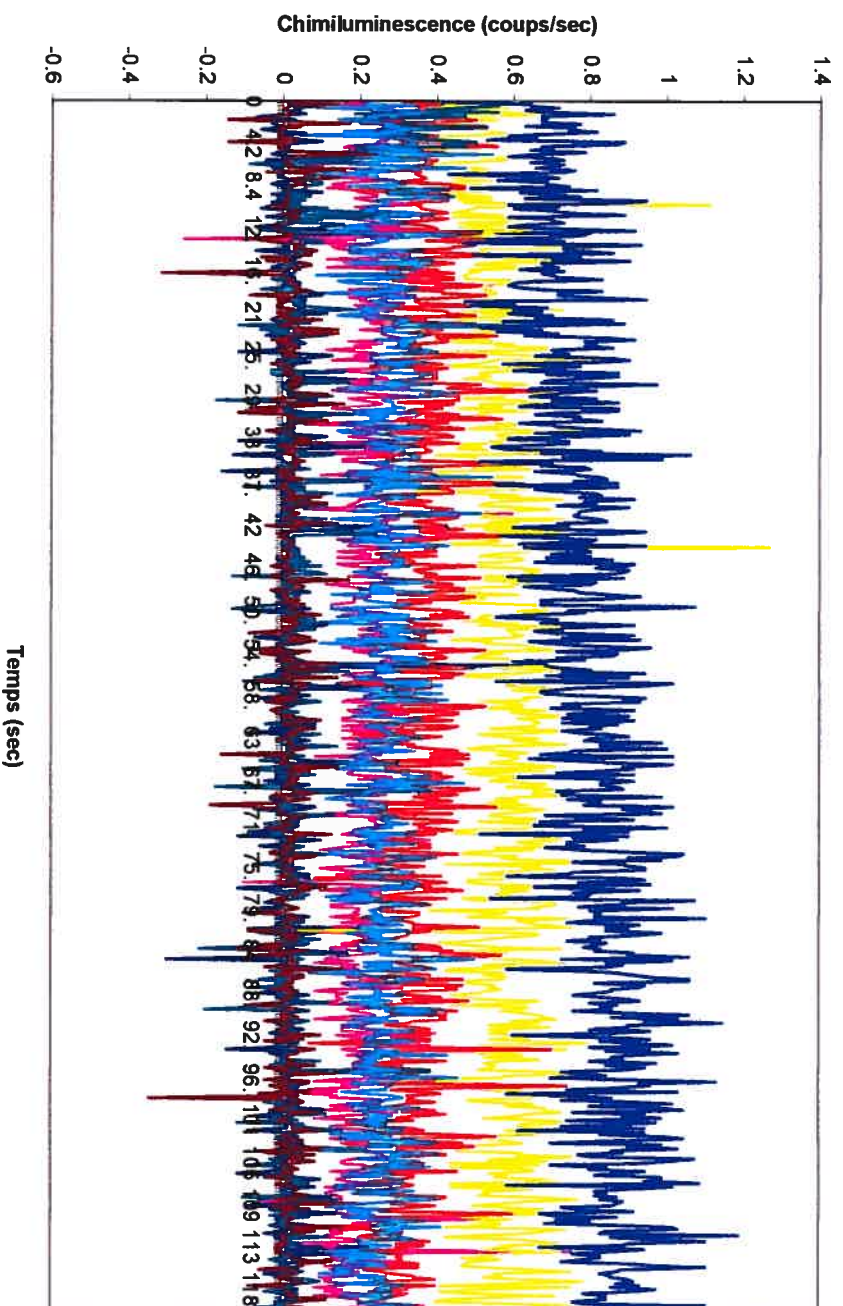
- Cellules fraîches seules (0,008)
- Cellules fraîches avec luminol (0,128)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (0,217)
- Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (0,147)
- Cellules congelées seules (0,026)
- Cellules congelées avec luminol (0,021)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,225)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,110)

## Sujet P14



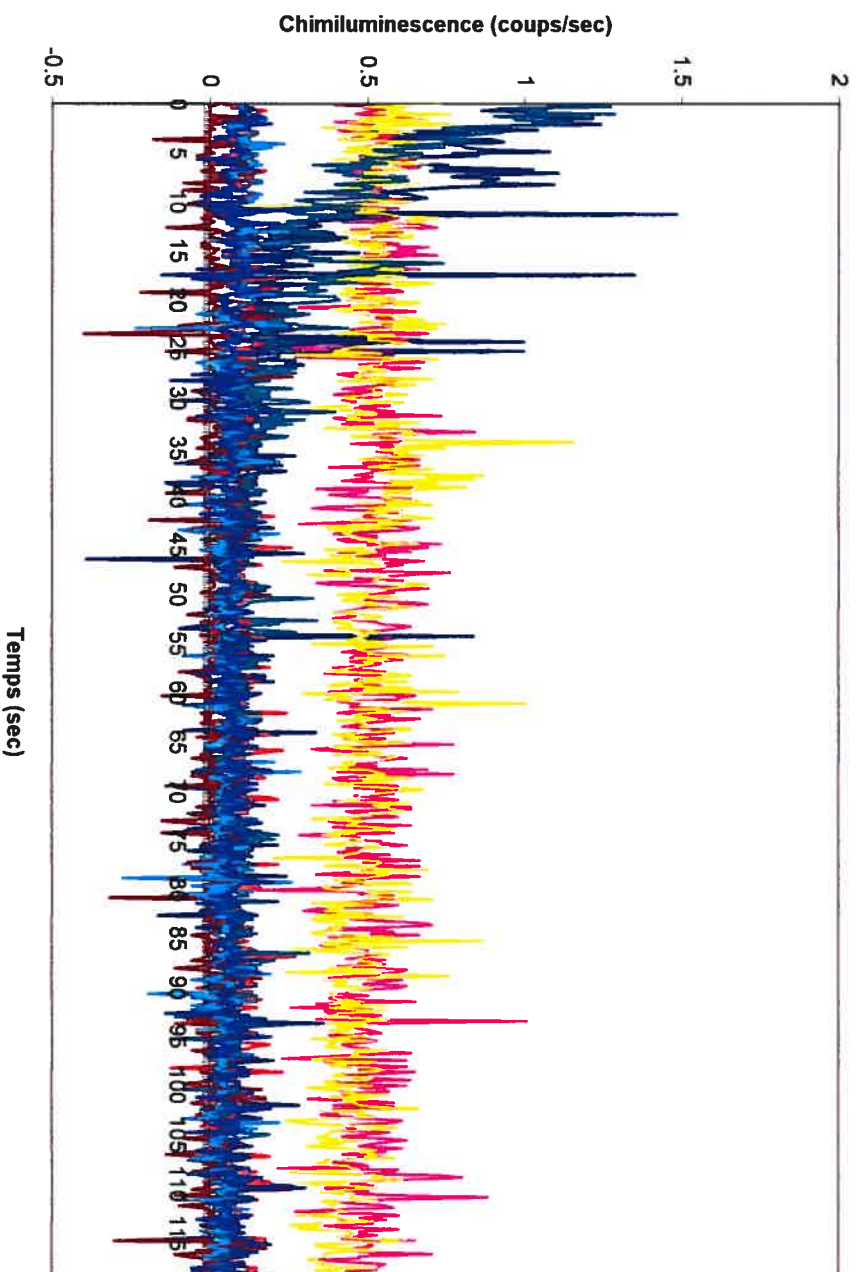
— Cellules fraîches seules (0,024)
— Cellules fraîches avec luminol (3,935)
— Cellules fraîches avec luminol et NADPH (3,036)
— Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (0,228)
— Cellules congelées seules (0,052)
— Cellules congelées avec luminol (0,026)
— Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,215)
— Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,312)

## Sujet P15



- Cellules fraîches seules (0,021)
- Cellules fraîches avec luminol (0,213)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (0,575)
- Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (0,358)
- Cellules congelées seules (0,041)
- Cellules congelées avec luminol (0,019)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,264)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,800)

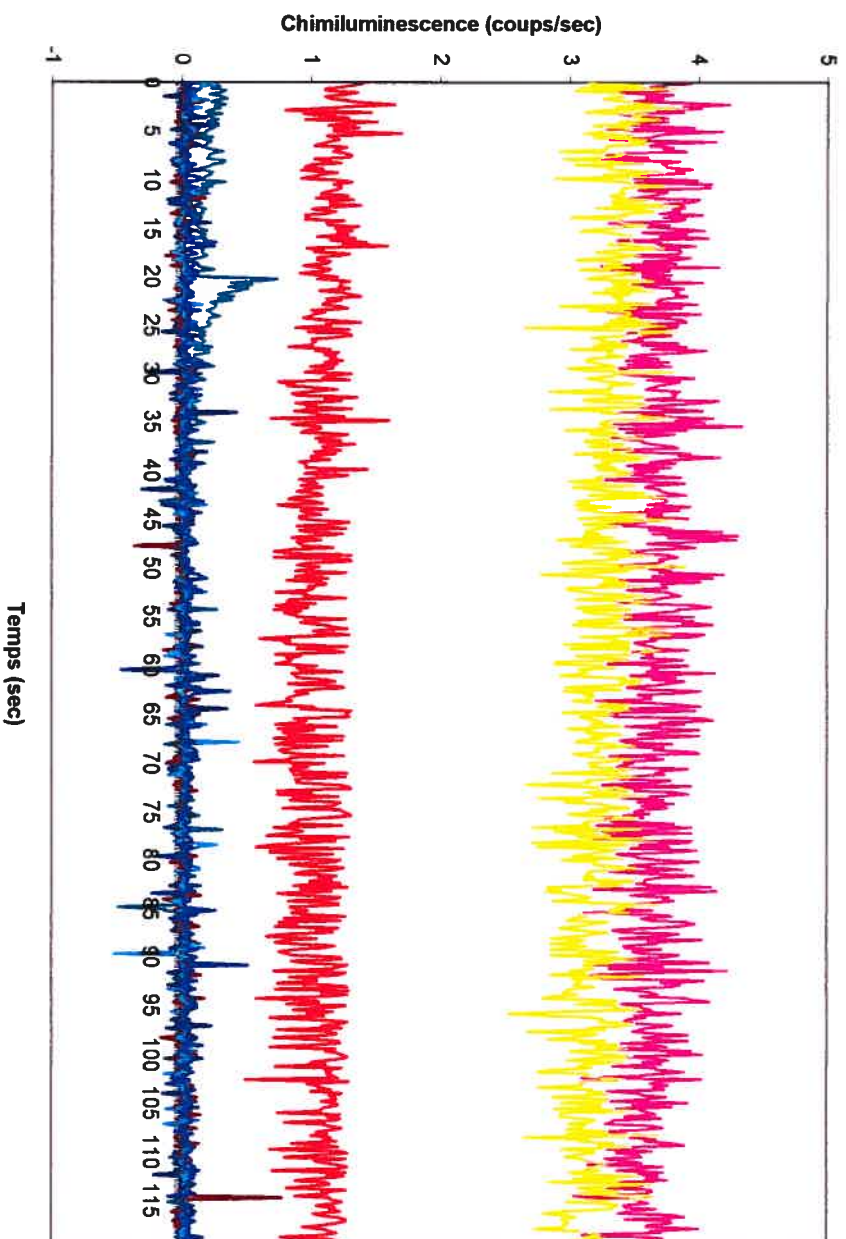
## Sujet P16



- Cellules fraîches seules (0,163)
- Cellules fraîches avec luminol (0,511)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (0,496)
- Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (0,089)
- Cellules congelées seules (0,163)
- Cellules congelées avec luminol (0,003)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,062)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,075)

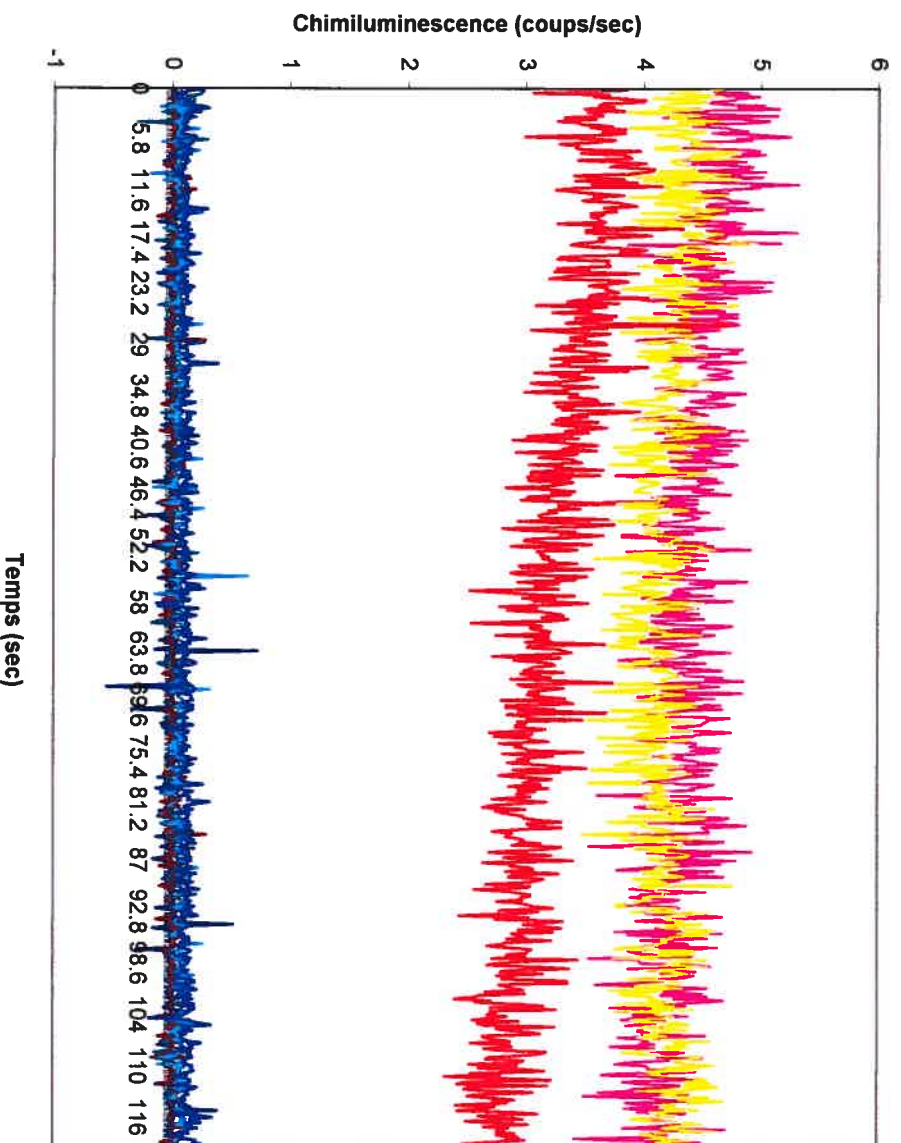


## Sujet P17



- Cellules fraîches seules (0,015)
- Cellules fraîches avec luminol (3,667)
- Cellules fraîches avec luminol et NADPH (3,254)
- Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (1,062)
- Cellules congelées seules (0,071)
- Cellules congelées avec luminol (0,014)
- Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,029)
- Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,047)

## Sujet P18



— Cellules fraîches seules (0,019)

— Cellules fraîches avec luminol (4,374)

— Cellules fraîches avec luminol et NADPH (4,197)

— Cellules fraîches avec luminol, NADPH et MKF (3,206)

— Cellules congelées seules (0,016)

— Cellules congelées avec luminol (0,007)

— Cellules congelées avec luminol et NADPH (0,072)

— Cellules congelées avec luminol, NADPH et MKF (0,118)

